

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. med. vet. Katja Nuss, Musculoskeletal Research Unit (MSRU)

***In-vivo-Studie über die Biokompatibilität, Verteilung und Resorbierbarkeit
von intraartikulär applizierten Siliziumnitrid-Partikeln
am Tiermodell Ratte***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Florian Hipp

Tierarzt
aus Dachau, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. em. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

2017

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. med. vet. Katja Nuss, Musculoskeletal Research Unit (MSRU)

***In-vivo-Studie über die Biokompatibilität, Verteilung und Resorbierbarkeit
von intraartikulär applizierten Siliziumnitrid-Partikeln
am Tiermodell Ratte***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Florian Hipp

Tierarzt
aus Dachau, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. em. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

2017

Für meine Eltern Marianne und Wolfgang
Für meine Brüder Manuel und Lorenz
Und für meine Freundin Bettina

...denn ohne sie wäre nichts von Bedeutung.

Zusammenfassung	1
Summary.....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Hintergrund.....	3
1.2 Problemstellung	4
1.3 Problemlösung/ Ziel des Projektes	5
1.4 Ziel der Dissertation.....	6
2 Literaturübersicht.....	8
2.1 Gründe für den Einsatz von künstlichen Gelenken	8
2.1.1 Ursachen	8
2.1.2 Gründe	8
2.2 Historische Entwicklung von Endoprothesen.....	9
2.3 Hüft-Totalendoprothesen aktuell	11
2.3.1 Standfestigkeit	11
2.3.2 Gesellschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung von Hüftendoprothesen	12
2.4 Verankerung von Endoprothesen.....	12
2.5 Ursachen für das vorzeitige Versagen von Gelenkendoprothesen	13
2.6 Symptome eines Implantat-Versagens am Beispiel von Hüftendoprothesen....	14
2.7 Abrieb und Abriebpartikel in der Endoprothetik.....	15
2.7.1 Entstehung von Abrieb	15
2.7.2 Reaktion des Gewebes auf Abriebpartikel.....	15
2.8 Materialpaarungen bei Gelenkendoprothesen	16
2.8.1 Grundlagen.....	16
2.8.2 Vor- und Nachteile verschiedener Gleitpaarungen anhand ausgewählter Beispiele.....	17
2.9 Materialien in der Endoprothetik und deren spezifische Eigenschaften und Gewebereaktion	18
2.9.1 Materialeigenschaften von Metalllegierungen und deren Gewebereaktionen am Beispiel von Kobalt-Chrom-Legierungen (CoCr):	18
2.9.2 Materialeigenschaften von Keramiken und deren Gewebereaktionen am Beispiel von Siliziumnitrid (Si ₃ N ₄).....	20
2.9.3 Materialeigenschaften von Kunststoffen und deren Gewebereaktionen	23

2.9.4	Resorbierbare Abriebpartikel	24
2.10	Biokompatibilität.....	24
2.11	Tiermodell	26
2.11.1	In-vivo Tiermodell	26
2.11.2	Lokalisation der Applikation.....	27
2.11.3	Die Ratte als Versuchstier	28
<hr/>		
3	Material und Methoden	29
3.1	Tiere	29
3.2	Aufbau der Studie.....	29
3.3	Materialien	30
3.3.1	Referenz-Substanz (R)	30
3.3.2	Test-Substanz (T): Siliziumnitrid (Si_3N_4).....	31
3.3.3	Verdünnung der Stammlösungen	35
3.4	Massnahmen und Tierhaltung in der Akklimatisationsphase	37
3.5	Operation/ chirurgischer Eingriff.....	38
3.5.1	Vorbereitende Massnahmen	38
3.5.2	Anästhesie	39
3.5.3	Präoperative Massnahmen.....	40
3.5.4	Chirurgischer Eingriff	40
3.5.5	Postoperatives Management.....	42
3.6	Euthanasie	43
3.7	Probengewinnung und Probenaufbereitung	43
3.7.1	Probengewinnung.....	43
3.7.2	Probenaufbereitung	45
3.8	Digitalisieren und Archivieren der Dünnschnitte.....	50
3.9	Histologische Evaluation.....	50
3.9.1	Histologische Evaluation der Weichteilgewebe.....	50
3.9.2	Histologische Evaluation der Hartgewebe (Kniegelenke)	55
3.9.3	Statistische Auswertung	62
<hr/>		
4	Resultate	63
4.1	Tierhaltung	63
4.2	Chirurgischer Eingriff	63
4.2.1	Anästhesie	63

4.2.2	Präoperative Massnahmen	63
4.2.3	Intraartikuläre Injektion	63
4.3	Postoperative Phase	64
4.4	Euthanasie	64
4.5	Tierkörpertransport	64
4.6	Probengewinnung und Fixation der entnommenen Gewebeproben	64
4.6.1	Entnahme der Weichteilgewebe	64
4.6.2	Entnahme der Kniegelenke	65
4.7	Probenaufbereitung	65
4.8	Histologische Evaluation und statistische Aufarbeitung	66
4.8.1	Evaluierung der Kniegelenke	67
4.8.2	Popliteallymphknoten	82
4.8.3	Inguinallymphknoten	89
4.8.4	Nieren	96
4.8.5	Leber	98
4.8.6	Milz	99
5	Diskussion	101
5.1	Tiermodell und Versuchsaufbau	101
5.1.1	Versuchsaufbau	101
5.1.2	Tiermodell	101
5.2	Klinischer Eingriff/ Operation	102
5.3	Probenentnahme und Probenaufbereitung	103
5.4	Statistische Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse	104
5.4.1	Kniegelenk	105
5.4.2	Popliteallymphknoten	111
5.4.3	Inguinallymphknoten	113
5.4.4	Niere und Milz	116
5.4.5	Leber	117
6	Schlussfolgerung	118
7	Perspektive	120
8	Literaturverzeichnis	121

9	Abkürzungsverzeichnis	125
10	Anhang	127
10.1	Tabellen	127
10.2	Abbildungen	130
<hr/>		
	Danksagung	
	Curriculum Vitae	

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde Si_3N_4 als biokompatible Beschichtung für metallene Anteile von Hüftprothesen untersucht.

Zur Prüfung der Biokompatibilität wurden Si_3N_4 -Nanopartikel in Kniegelenke von Ratten injiziert und lokale Gewebereaktionen verschiedener Weichteilgewebe untersucht. Auf diese Weise konnten die Biokompatibilität, Verteilungs- und Ausscheidungswege sowie die Resorbierbarkeit von Si_3N_4 -Nanopartikeln in vivo bewertet werden. Als Vergleichssubstanz dienten CoCr-Nanopartikel.

Die 48 verwendeten Tiere wurden in 8 verschiedene Gruppen eingeteilt, welche sich in der Art der verabreichten Substanz, der Dosierung sowie im postoperativen Überlebenszeitraum unterschieden.

Die Nanopartikel wurden in die rechten Kniegelenke der Tiere appliziert, die linken Knie blieben unbehandelt und dienten als Negativkontrolle.

Nach Aufbereitung der Gewebeproben wurden diese histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Sowohl unter der Behandlung mit Si_3N_4 als auch mit CoCr zeigten sich Gewebereaktionen, welche nach CoCr-Injektion insgesamt deutlich stärker ausgeprägt waren als nach Si_3N_4 -Injektion. Letztere zeigten im Vergleich mildere zelluläre Reaktionen.

Die Partikel beider Substanzen wurden in das umliegende Gewebe verteilt, wobei diese Verteilung aber örtlich begrenzt war und die Menge mit zunehmender Überlebenszeit abnahm.

Die Resorbierbarkeit von Si_3N_4 in vivo konnte in dieser Studie nicht abschliessend geklärt werden und bedarf weiterer Forschung.

Summary

In this study Si_3N_4 was investigated as biocompatible coating for metallic parts of hip prostheses.

To test biocompatibility of Si_3N_4 , tissue reactions after intraarticular injection of silicon nitride nanoparticles into the stifle joint of rats were examined.

This was done in order to examine the cellular reaction, ways of distribution and excretion as well as the absorbability of Si_3N_4 -nanoparticles in an in vivo experiment.

CoCr-nanoparticles served as controls.

The experimental setup of this study included 48 animals distributed into 8 different groups, varying in the aspects of the administered substances and their dosage, as well as the granted survival time post operative.

The corresponding substances were administered solely into the right knee of each animal, the left knee of each animal remained untreated and served as negative control.

After preparing, the tissue samples were histologically and immunohistochemically examined.

The treatment with both Si_3N_4 as well as CoCr elicited cellular responses, however, they were clearly more pronounced under the treatment with CoCr than under the treatment with Si_3N_4 .

The latter proved to be biocompatible, since reactions were minimal and subsided quickly.

Particles of both substances were distributed into the surrounding tissues, nevertheless the distribution was locally limited and decreased over time.

The absorbability of Si_3N_4 in this in vivo study could not be conclusively determined and further research will be required.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Seit den Erkenntnissen von Sir John Charnley zur stabilen Prothesenverankerung durch den Einsatz von Knochenzement, welche die Anwendung der ersten erfolgreichen Hüft-Totalendoprothesen durch McKee und Watson-Farrar Anfang der 1960er Jahre ermöglichte, hat sich das Wissen über die Herstellung und den Einsatz von Total-Endoprothesen stark weiterentwickelt.

Durch die demographische Veränderung der Gesellschaft mit mehr älteren Menschen, die im Alter zunehmend Erkrankungen des Bewegungsapparates entwickeln, steigt der Bedarf an Endoprothesen.

Die Weiterentwicklung der operativen Versorgung umfasst nicht nur neue Bauformen, Herstellungs-, Implantations- sowie Verankerungstechniken, sondern auch den Einsatz neuer bildgebender Verfahren, medizinisch-physiotherapeutischer Arbeit mit dem Patienten vor und nach der Operation sowie verbesserte, standardisierte Nachkontrollen. Vor allem der Einsatz von neuen, innovativen Materialien war ein ganz entscheidender Faktor für die Verbesserung von Prothesen hinsichtlich deren Standfestigkeit, also deren Funktionsfähigkeit und Verweildauer im Körper.

Trotz dieser allgemeinen Verbesserungen ist die Lebensdauer einer Endoprothese immer noch zeitlich beschränkt.

So werden zwar als durchschnittliche Lebenszeit von Endoprothesen vom Hersteller meist 15 Jahre oder sogar mehr angegeben¹. Laut dem schwedischen Register für den Austausch von Hüft-Totalendoprothesen liegt der Prozentsatz von primären Revisionsoperationen jedoch innerhalb eines Zeitraums von acht Jahren (1992-2000) zwischen 7,4% und 27,3%, abhängig von der Art der Verankerung². Nach dieser Zeit ist eine Revisionsoperation mit Ersatz der alten Prothese nötig. Dies bedeutet für den Patienten zumeist eine deutliche Verringerung seiner Lebensqualität und birgt das Risiko von Komplikationen während und nach der Operation. Für die Kostenträger stellt dies zudem einen stark erhöhten Kostenaufwand dar.

1.2 Problemstellung

Die Verweildauer einer Gelenk-Endoprothese bei Beibehaltung ihrer Funktionalität wird durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst.

Diese sind, unter anderem, die individuelle Anpassung der Prothese an den jeweiligen Patienten (Form, Grösse, Abmessungen und Tragfähigkeit der Prothese), die Wahl der Implantationstechnik und deren Ausführung, die Materialpaarung (z.B. Metall/Metall, Metall/Polyethylen), die Verankerung der Prothese (zementlos, zementiert) sowie der Patient selbst (z.B. Gesundheitsstatus, Alter, Gewicht, Allergien, Vorerkrankungen).

Da ein vorzeitiges Versagen von Prothesen aber häufig materialbedingt ist, ist einer der wichtigsten Faktoren für die „Verträglichkeit“ einer Endoprothese die Wahl geeigneter, also biokompatibler Materialien, welche keine oder nur minimale negative Gewebereaktionen des Körpers hervorrufen.

So spielen die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Materials eine massgebliche Rolle. Darunter fallen Korrosionseigenschaften sowie das tribologische Verhalten (Reibungs-, Verschleiss- und Schmierungseigenschaften) des verwendeten Materials. Zusammengefasst bezeichnet man diese als die tribokorrosive Eigenschaften. Die Hauptursache für ein vorzeitiges materialbedingtes Implantat-Versagen liegt begründet in der unvermeidbaren Generierung von Abriebpartikeln. Diese entstehen durch die Reibung der beiden Gleitpartner einer Prothese. Hinsichtlich der Menge an entstehendem Abrieb spielen die tribokorrosiven Eigenschaften der verwendeten Gleitpartner die entscheidende Rolle.

Die durch die Gleitreibung entstehenden Partikel lagern sich im Gelenk ab, verteilen sich im umliegenden Gewebe und können unter Umständen sogar über das Lymph- oder Blutgefässsystem abgeschwemmt und dadurch systemisch im Organismus verteilt werden.

Die Abriebpartikel werden vom Immunsystem des Körpers als fremd erkannt. Sie können, je nach ihren biologischen Eigenschaften, dadurch Fremdkörperreaktionen wie Entzündungsreaktionen, Materialunverträglichkeiten, Allergien und Pseudotumoren als Folge der Reaktion des Materials mit dem umliegenden Gewebe hervorrufen.

Dabei kommt es zu einer Abstossungs- bzw. Abkapselungsreaktion des mit der Prothese in Kontakt stehenden Gewebes. Diese treten hauptsächlich auf in Form von klassischen Entzündungsreaktionen mit Einwanderung von Entzündungszellen und strukturellem Umbau des Gewebes bis hin zu Fibrosierung und Kapselbildung um die Prothese. Sir John Charnley, ein Vorreiter in der Entwicklung von Endo-Prothesen und der damit in

Zusammenhang stehenden Problemstellung von Abstossungsreaktionen auf solche Prothesen hat dies treffend in einem Zitat formuliert:

„The cart has been put before the horse; the artificial joint has been made and used, and now we are trying to find out how and why it fails.“³

1.3 Problemlösung/ Ziel des Projektes

Diese Studie ist Teil eines mehrjährigen, mehrstufigen Kooperationsprojektes, das verschiedene europäische Universitäten (Technische Universität Hamburg-Harburg (D), Universität Leeds (GB), Universität Linköping (S), Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (CH), Universität Zürich (CH)), Krankenhäuser (Leeds Teaching Hospitals Trust (GB), Schulthess Klinik Zürich (CH)) und Herstellerfirmen (Aesculap, Ionbond, ABT, Simulation Solutions, TuTECH, Peter Brehm) mit einbezieht. Ziel dieser Studie ist die Erforschung einer neuartigen Beschichtung aus Siliziumnitrid für Metallendoprothesen.

Diese Keramikbeschichtung weist sehr gute tribologische¹ Eigenschaften auf. Ein neuartiges Beschichtungsverfahren, das so genannte Hochleistungsimpuls-Magnetronsputter-Verfahren (PVD-HIPIMS), eine innovative Form der Gasphasenabscheidung, führt zudem zu einer stark reduzierten Oberflächenrauigkeit, einer deutlich verringerten Anzahl von Oberflächendefekten sowie zu einer stark erhöhten Adhäsion an das Kernmaterial. Dies hat zum einen zur Folge, dass sowohl deutlich weniger Abrieb in Paarung mit einem Gleitpartner generiert wird und zum anderen, dass die Gefahr einer Ablösung der Beschichtung von seinem Untergrund stark verringert wird.

Die Kombination von innovativem Oberflächenmaterial und Beschichtungstechnik mit den exzellenten statisch-physikalischen Eigenschaften von Metalllegierungen als Kernsubstanz der Prothese ergibt ein Produkt mit aussergewöhnlich guten tribokorrosiven, physikalisch-statischen sowie biologischen Eigenschaften.

Die Verbesserungen der oben genannten tribokorrosiven Eigenschaften resultiert in einem deutlich verringerten Materialabrieb. Die wenigen, durch Abrieb gebildeten Partikel sollen zudem einerseits biologisch inert sein, d.h. im umgebenden Gewebe

¹ Tribologie: Wissenschaft von Reibung, Verschleiss und Schmierung gegeneinander bewegter Körper (Duden, Fremdwörterbuch, 7. Auflage, Dudenverlag Mannheim, 2001)

keine bzw. kaum Reaktionen hervorrufen, und zum anderen sollen diese Partikel resorbierbar sein, also vom Organismus in ausscheidbare Abbauprodukte zerlegt werden können, ohne dadurch einzelne Organe oder gar den ganzen Organismus zu schädigen.

Der verminderte Abrieb, gepaart mit biologisch inerten und resorbierbaren Partikeln, soll damit zu einer hohen Biokompatibilität, d.h. zu deutlich verringerten Reaktionen des die Prothese umgebenden Gewebes in Form von Entzündungs-, Fremdkörper- bzw. und Abstossungsreaktionen führen. Diese Verminderung der Abstossungsreaktionen soll zu einer signifikanten Verlängerung der möglichen Verweildauer der Prothese im Gelenk bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung ihrer Funktionalität – im Sinne einer Erhöhung ihrer Standfestigkeit - führen. Diese würde eine spürbare Verbesserung der Lebensqualität des Patienten nach sich ziehen, da frühzeitige Revisionsoperationen vermieden werden können.

1.4 Ziel der Dissertation

Diese Dissertation hat zum Ziel, in einem Tiermodell an der Ratte erstmals in vivo die Biokompatibilität sowie den Ausscheidungsweg von Partikeln einer Siliziumnitrid-Nichtoxidkeramik-Beschichtung zu testen.

Hierfür wurde ein Tiermodell gewählt, in welchem insgesamt 48 junge, gesunde, männliche HanWistar-Ratten eingesetzt wurden. Diese wurden auf acht Gruppen zu je sechs Tieren aufgeteilt. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des eingebrachten Materials (Siliziumnitrid als Testsubstanz, Kobalt-Chrom als Referenzsubstanz), der Dosierung (hohe und niedrige Dosierung) sowie des postoperativen Überlebenszeitraumes (zwei bzw. sieben Tage).

Die jeweilige Substanz wurde den Tieren in Form von in Lösung gebrachten Nanopartikeln in das rechte Kniegelenk injiziert, das linke (unbehandelte) Gelenk diente als Kontrolle.

Jeweils beide Kniegelenke sowie Leber, Milz, Nieren und regionale Lymphknoten wurden nach der jeweiligen Überlebenszeit entnommen, histologisch aufgearbeitet und evaluiert.

Bei der histologischen Auswertung der Proben lag der Fokus auf der Erkennung von Entzündungs- und Abstossungsreaktionen, sichtbar als strukturelle Gewebeveränderungen sowie durch das Auftreten einer erhöhten Anzahl von

Entzündungszellen. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Untersuchung der Proben hinsichtlich zweier chemischer Entzündungsparameter durchgeführt.

2 Literaturübersicht

Die Literaturübersicht dieser Dissertation beschränkt sich auf Hüft-Endoprothesen, da diese hinsichtlich der Anzahl an implantierten Prothesen und der dadurch entstehenden Kosten die grösste medizinische, wirtschaftliche und gesellschaftliche Bedeutung im Vergleich mit Endoprothesen anderer Lokalisationen hat. Auch aus technologischer Sicht können Hüftprothesen gut als Beispiel dienen. Dies liegt vor allem an der ausserordentlichen Vielfalt an unterschiedlichen Modellen, Formen und Materialien (im Vergleich zu Knie- oder distalen Bein-Endoprothesen¹⁻³).

2.1 Gründe für den Einsatz von künstlichen Gelenken

2.1.1 Ursachen

Die Ursachen für den Einsatz von künstlichen Gelenken sind vielfältig. Die am häufigsten genannten Gründe sind erworbene, destruktive Gelenksveränderungen wie idiopathische Arthrosen, entzündliche Gelenkerkrankungen, dysplastische Gelenke, angeborene oder erworbene Gelenkfehlbildungen sowie rheumatische Arthrosen, toxische (z.B. medikamentöse) Gelenkzerstörungen, Frakturen des proximalen Femur, sonstige Traumata im Bereich der knöchernen Anteile des betreffenden Gelenkes sowie posttraumatische Folgezustände⁴.

2.1.2 Gründe

Gelenkerkrankungen stellen für die betroffenen Patienten eine erhebliche Einschränkung ihrer Lebensqualität dar, da diese Erkrankungen zumeist ein hohes Mass an Schmerzen und eine deutliche Einschränkung der Funktionalität des betroffenen Gelenkes und somit eine enorme Verringerung der Beweglichkeit und Mobilität für den Betroffenen nach sich ziehen.

Wenn man z.B. die Implantation einer Total-Hüftendoprothese mit anderen chirurgischen Eingriffen vergleicht, ist dieser Eingriff eine der erfolgreichsten chirurgischen Prozeduren hinsichtlich der Effektivität und Verbesserung des Lebensstandards von Patienten⁵. Diese Verbesserung der Lebensqualität wird durch zwei Komponenten massgeblich bestimmt. Zum Einen kann durch den Einsatz von Endoprothesen eine erhebliche bis vollständige Reduktion der Schmerzen erreicht werden, zum Anderen die Funktionalität und somit die Mobilität der betreffenden

Personen deutlich erhöht werden. So ist ein Kernpunkt des Erfolges einer Total-Endoprothese deren Langlebigkeit sowie deren Fähigkeit, bei gleichzeitiger Schmerzlinderung einen Schutz vor Wiederauftreten dieser Schmerzen zu bieten⁶.

Zudem stellen Hüft- und Knie-Totalendoprothesen verlässliche und geeignete chirurgische Massnahmen dar, um Patienten wieder zu mobilisieren⁷, wobei Ersteingriffe grössere relative Verbesserungen in der Lebensqualität erzielen als Revisionsoperationen⁷. So ist der Komplettersatz von Gelenken durch die Implantation von permanenten Endoprothesen einer der Haupterfolge der modernen Chirurgie in Zusammenhang mit Schmerzlinderung und der Wiederherstellung der Mobilität der Patienten, was dem Patienten somit eine aktivere Teilnahme an seinem Leben ermöglicht⁸.

2.2 Historische Entwicklung von Endoprothesen

Bis in das späte 18. Jahrhundert bedeutete die chirurgische Behandlung von Hüftgelenkpathologien eine Amputation der erkrankten Gliedmasse. Dies geschah ohne Narkose und war ein extrem schmerzhafter und radikaler Eingriff. Diese Prozedur war jedoch nach dem damaligen Wissensstand die einzige Möglichkeit, eine Schmerzreduktion und oft auch das Überleben des Patienten zu sichern.

Anthony White wird die erste, in der Literatur vermerkte Hüftgelenks-Exzision zugerechnet. Hierbei wurden der Femurkopf sowie -hals mitsamt den Trochanteren chirurgisch entfernt, die Gliedmasse jedoch blieb erhalten. Dadurch konnte eine Verminderung der Schmerzen des betroffenen Patienten und zugleich in geringem Ausmass eine Aufrechterhaltung von Mobilität und Funktionalität der betroffenen Gliedmasse erreicht werden⁹.

Der Einsatz einer Kobalt-Chrom Legierung, genannt „Vitallium“, welche erstmals als sogenanntes biologisch inertes Material im Jahre 1932 in Form von Zahnimplantaten verwendet wurde, kann als weiterer Meilenstein in der Entwicklung von Endoprothesen angesehen werden. Massgeblich beteiligt hierbei war Austin Moore, welcher 1943 die erste Endoprothese aus Kobalt-Chrom entwickelte und erfolgreich anwendete¹⁰.

Eine der ersten, teilweise erfolgreichen Hüftgelenksplastiken, war der sogenannte „Smith-Petersen Cup“, welcher 1935 in Boston, Massachusetts entwickelt wurde. Dieser bestand lediglich aus einer dünnwandigen Metallkappe, welche in die Gelenkhöhle des Acetabulums eingepasst wurde. Bemerkenswert hierbei war, dass die

Metallkappe nicht im Hüftknochen verankert wurde, sondern frei beweglich in der Knochenhöhle des Hüftknochens platziert war. Die Idee dahinter war, Platz für eine Regeneration der knorpeligen Gelenkfläche zu schaffen. Diese Technik zeigte jedoch unbefriedigende Langzeitergebnisse.

In den frühen 1950er Jahren wurde in Paris die Judet-Prothese durch Robert Judet entwickelt. Diese ermöglichte eine Prozedur, in welcher der beschädigte Oberschenkelkopf komplett reseziert und durch einen künstlichen Kopf ersetzt wurde. Diese Technik zeigte erstmals gute bis sehr gute Kurzzeitergebnisse in der Schmerzreduktion und Erhöhung der Funktionalität und Mobilität.

Erste Versuche einer Total-Hüftendoprothese mit Ersatz von Femurkopf und Acetabulum wurden durchgeführt im Jahre 1951 in Norwich, England - allerdings mit geringem Erfolg.

Erst die Überlegungen von Sir John Charnley über die Gleiteigenschaften von Materialien, den Einsatz von Schmierstoffen und der daraus resultierenden Einführung des „concept of low friction arthroplasty“¹¹ sowie der erstmaligen Verwendung von „Ultra-high-molecular-weight polyethylene“ (UHMWPE)¹¹ und noch später, in den 1960er Jahren, der Einführung und Verwendung von Knochenzement in Form von Methylmethacrylat (MMA), brachte den Durchbruch. Einerseits konnte durch den Einsatz von hochverdichtetem Polyethylen die Gleitreibung minimiert und somit die Menge an Abrieb stark reduziert werden, andererseits durch den Einsatz von Knochenzement eine dauerhaft haltbare Verankerung der femoralen und acetabulären Komponenten der Endoprothesen ermöglicht werden. Dies begründete die Entwicklung von vollkommen neuen Prothesenmodellen.

Hierbei waren vor allem die Forscher McKnee und Watson-Farrar massgeblich beteiligt, welche Anfang der 1950er Jahre neuartige Hüft-Totalendoprothesen entwickelten und gute bis sehr gute Resultate hinsichtlich Funktionalität und Schmerzreduktion in den betroffenen Patienten erzielten. 1961 adaptierte McKee die zementierte Verankerungstechnik von Sir John Charnley, um sowohl Pfanne als auch den künstlichen Femurkopf zu verankern und erzielte damit herausragende Ergebnisse^{5,12-14}. Ein weiterer bedeutsamer Schritt stellte die Einführung von hart-auf-hart artikulierenden Gleitflächen dar. So wurden Metall-auf-Metall und Keramik-auf-Keramik oder auch Metall-auf-Keramik-Gleitpaarungen als Alternativen zu herkömmlichem Polyethylen in Hüftgelenkendoprothesen eingeführt, um den starken

Abrieb des Polyethylens gegenüber seinem harten Gleitpartner (in der Regel Metall) zu reduzieren^{6,15}.

2.3 Hüft-Totalendoprothesen aktuell

2.3.1 Standfestigkeit

Die Standfestigkeit, also die Verweildauer einer Prothese im Körper eines Patienten, in welcher diese ihre gewünschte Funktion erfüllt, hängt von einer grossen Anzahl von Faktoren ab. So ist sie unter anderem abhängig von der Art des zu ersetzenden Gelenkes sowie der Art des zugrunde liegenden Krankheitsbildes und dessen Ausprägungsgrades. Des Weiteren ist die Verweildauer abhängig von individuellen Faktoren des Patienten selbst, wie zum Beispiel Alter, Gesundheitszustand, Aktivitätsgrad oder Begleiterkrankungen. Die Angaben von Prothesenherstellern auf der einen und den Angaben von Autoren der aktuellen Fachliteratur auf der anderen Seite, aber auch zwischen den genannten Autoren gehen hierbei zum Teil deutlich auseinander.

So geben Hersteller von Hüftendoprothesen eine Standzeit von etwa 15 Jahren an⁸.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Prozentzahl von Endoprothesen, welche eine erheblich kürzere Standzeit aufweisen als prognostiziert, deutlich höher ausfällt als angegeben. So ergab eine Studie von Linder et al. bei 3,7% der geprüften Fälle innerhalb von nur zwei Jahren ein frühzeitiges Versagen der Prothesen. Die Gründe waren zu etwa 80% auf mechanische Ursachen und zu 18-19% auf Infektionen und Entzündungen zurückzuführen. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Lokalisation der betreffenden Prothesen konnte nicht nachgewiesen werden¹.

Eine Studie von Labek et al., basierend auf einem Datensatz von sechs verschiedenen Ländern und Regionen, gibt eine durchschnittliche Revisionsrate von Totalhüftendoprothesen von 6,45% nach fünf Jahren sowie von 12,9% nach 10 Jahren an¹⁶.

In einem Vergleich der Datensätze von Medicare, der öffentlichen, bundesstaatlichen Krankenversicherung innerhalb des Gesundheitssystem der USA und dem zentralen schwedischen Hüftregister sowie dem norwegischen Register über Gelenkendoprothesen innerhalb eines Zeitraumes von 1997 bis 2004 ergab sich eine Revisionsrate der überprüften Prothesen von 3,6% in den USA, 2,2% in Norwegen und 1,8% in Schweden¹⁷. Andere Autoren berichten von einer Standfestigkeit von 10-15 Jahren für 90-95% der getesteten Endoprothesen⁸.

Eine Studie von Billi et al. ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Verweildauer einer Endoprothese bzw. der Notwendigkeit einer Revisionsoperation und der Menge an gebildeten Abriebpartikeln⁶.

2.3.2 Gesellschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung von Hüftendoprothesen

Die enorm hohe Anzahl an jährlich implantierten Hüftendoprothesen und die daraus resultierenden finanziellen Aufwendungen für die medizinischen Kostenträger sowie der deutlich erkennbare, steigende Bedarf an solchen Prothesen resultieren in einer grossen wirtschaftlichen und gesellschaftlichen Bedeutung für die Gesellschaft.

Einer der häufigsten Indikationen für einen künstlichen Gelenkersatz ist das Krankheitsbild der Osteoarthritis. So leiden in Deutschland über 5 Millionen Menschen an dieser Krankheit¹⁸ und allein im Jahre 2002 wurden innerhalb Deutschlands über 150.000 Hüftendoprothesen implantiert¹⁹. In den USA litten im Jahr 2005 etwa 10 % der Bevölkerung über 60 Jahren an diesem Krankheitsbild, was einer Zahl von 20 Millionen Menschen entspricht. Bei einer Gesamtzahl von etwa 300.000 implantierten Total-Hüftgelenkendoprothesen in den USA entspricht dies Kosten von mehr als 60 Milliarden Dollar pro Jahr. Für primäre Hüftgelenkendoprothesen liegt die geschätzte Kostensteigerung allein für Krankenhauskosten im Zeitraum von 2005-2015 bei 340% sowie bei 180% für Operationskosten innerhalb der USA^{5,17,20-22}.

2.4 Verankerung von Endoprothesen

Sowohl die femorale als auch die acetabuläre Komponente einer Hüft-Totalendoprothese kann entweder zementiert oder unzementiert verankert werden. Ist der acetabuläre Anteil unzementiert, der femorale Anteil jedoch mittels Zement verankert, spricht man von einer hybriden Verankerungstechnik. Der umgekehrte Fall wird als reverse oder umgekehrt hybride Verankerung bezeichnet^{4,23}.

Für den Einsatz von zementierten Prothesenschäften spricht unter anderem, dass für diese Verankerungstechnik bis zu 30 Jahre Erfahrung und Ergebnisse vorliegen⁴.

Auf der anderen Seite waren die in der Literatur beschriebenen, durch Knochenzement hervorgerufenen Abbauvorgänge mit anschliessenden Fremdkörper- und Abstossungsreaktionen der Grund für die Entwicklung von zementlosen

Verankerungstechniken. Heute werden diese, insbesondere beim jungen Patienten, als überlegen angesehen⁴.

Die Verankerungstechnik hat zum Teil auch Einfluss auf die Wahl der eingesetzten Materialien von Endoprothesen.

So wird beispielsweise für zementierbare Komponenten der Einsatz von Legierungen aus Kobalt-Chrom empfohlen, da diese weniger elastisch sind als Titan und somit den Zementmantel weniger schädigen⁴. Für unzementierte Verankerungen werden gerne Prothesenschafts aus Titanlegierungen verwendet. Sie sind Komponenten aus Kobalt-Chrom in der zementfreien Verankerungstechnik überlegen, da sie bezüglich ihrer Elastizität an die von Knochen heranreichen und damit die Osseointegration der Prothese fördern⁴.

2.5 Ursachen für das vorzeitige Versagen von Gelenkendoprothesen

Generell ist die Standfestigkeit einer Gelenkendoprothese zeitlich begrenzt. Dies mag bei sehr alten Patienten keine Rolle spielen, da die begrenzte Standzeit der Prothese in diesem Fall die verbleibende Lebenserwartung des Patienten übersteigt.

Für Patienten jüngeren Alters gilt dies jedoch nicht und somit wird (mindestens) eine belastende Revisionsoperation nötig. Da bei jeder dieser Operationen ein Teil der Knochensubstanz, welche zur Verankerung der Prothesenanteile benötigt wird, abgetragen werden muss, kann oft nur ein- oder maximal zweimal nachoperiert werden. Ist eine Revisionsoperation nicht mehr möglich, bleibt nur noch die Resektion bzw. Immobilisation des Gelenkes, was die Mobilität und Lebensqualität des Patienten extrem verringert. Ein Wechsel von Gelenkendoprothesen ist generell angezeigt im Falle von aseptischer oder septischer Lockerung, periprothetischen Frakturen, sonstigen Traumata oder Materialdefekten¹. Grundsätzlich gibt es mechanische und biologische Gründe für das vorzeitige Versagen einer Prothese.

2.5.1.1 Mechanische Ursachen

Als hauptsächliche mechanische Ursachen können rezidivierende Luxationen der betreffenden Gelenke, Inkongruenzen zwischen den Gleitpartnern, Frakturen durch lokale Belastungsabschirmung („stress shielding“) in der Umgebung des Implantates,

periprotetische Frakturen anderer Genese sowie Kleinstbewegungen zwischen der Prothesenverankerung und dem Knochen genannt werden⁸.

Der durch die Gleitpaarung des Kunstgelenkes entstehende Abrieb scheint der wichtigste limitierende Faktor für die Standzeit einer Prothese zu sein und somit die häufigste mechanische Ursache für ein vorzeitiges Implantatversagen durch Osteolyse und Prothesenlockerung^{4,18,24}.

2.5.1.2 Biologische Ursachen

Als biologische Ursachen für ein vorzeitiges Versagen von Prothesen müssen peri- oder postoperative Infektionen sowie die aseptische Lockerung genannt werden, wobei letztere eine Entzündung des periprotetischen Gewebes ohne nachweisbare Keime darstellt. Dies ist gleichzeitig die häufigste Ursache für Revisionsoperationen^{8,24}. Abriebpartikel werden auch hier als die Hauptbeteiligten für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer solchen aseptischen Lockerung betrachtet⁸.

Auf zellulärer Ebene ist dabei die Aktivität der Osteoklasten entscheidend, die den Knochenschwund, welcher im Zusammenhang mit aseptischer Implantatlockerung auftritt, mit verursachen⁸.

Zytokine wie TGF- α haben hierbei einen direkten Einfluss auf sowohl Osteoklasten als auch mehrkernige Riesenzellen. Andere Zytokine, wie z.B. IL-1, TNF- α und IL-6, beeinflussen Osteoklasten indirekt durch ihren Einfluss auf Osteoblasten und Makrophagen-gesteuerte Zellreaktionen, welche zu diesem Knochenschwund führen⁸.

2.6 Symptome eines Implantat-Versagens am Beispiel von Hüftendoprothesen

Die deutlichsten und häufigsten klinischen Symptome, welche als Indikatoren im Zusammenhang mit einem Implantat-Versagen genannt werden können, sind persistierende, teils äusserst starke Schmerzen im Hüftgelenk. Diese äussern sich zumeist eher als Belastungs- denn als Ruheschmerzen. Teilweise berichten betroffene Patienten zudem über das Gefühl einer grösseren Massen- oder Flüssigkeitsansammlung im Hüftbereich. Diese Empfindungen können zumeist in bildgebenden Verfahren in Form von Pseudotumoren bestätigt werden²⁵.

2.7 Abrieb und Abriebpartikel in der Endoprothetik

2.7.1 Entstehung von Abrieb

Die Generierung von Abrieb ist eine unvermeidbare Konsequenz der Bewegung von Gleitflächen zueinander. Abrieb kann durch vier verschiedene Mechanismen entstehen: Abrasion, Adhäsion, Korrosion und Ermüdungsverschleiss²⁶.

Abrasion bedeutet in diesem Zusammenhang das Abschleifen der äussersten Schicht von Gleitflächen. Hierbei ist die Oberflächenrauigkeit sowie die Härte der Gleitpartner von entscheidender Bedeutung. Je glatter die Oberfläche eines Gleitpartners, desto geringer fällt der Abrieb seines Gegenübers aus. Je härter das Material einer Gleitfläche, desto geringer ist seine Anfälligkeit, von seinem Gleitpartner abgeschliffen zu werden.

Adhäsion bezieht sich auf die Verzahnung der artikulierenden Gleitpartner durch mikroskopisch kleine Poren und Vertiefungen in deren Gleitflächen. Korrosion ist die chemische Reaktion eines Werkstoffes mit seiner Umgebung, wobei eine deutlich messbare Veränderung am Werkstoff eintritt. In der Endoprothetik spielt hier die Änderung der statisch-physikalischen Eigenschaften sowie die Bildung von gewebetoxischen Ionen aus Metalllegierungen die grösste Rolle. Ermüdungsverschleiss beschreibt einen langsam und kontinuierlich voranschreitenden Schädigungsprozess des Materials durch wechselnde mechanische Belastung, sowie eventuell zusätzliche korrosive Einflüsse. Dies bedeutet, dass eine Belastung, welche eigentlich noch im elastischen Bereich des Materials liegt und somit unterhalb dessen Streckgrenze, durch ständige Wiederholung zu einer Ermüdungsrissbildung oder auch zum Ermüdungsbruch führen kann. Mechanischer Abrieb und dessen biologische Folgen sind oft der primäre Grund für das Versagen von Gelenkimplantaten, da an Hüft-Endoprothesen jährlich Milliarden von Abriebpartikeln generiert werden, die dann im periprothetischen Gewebe kumulieren^{27,28}.

2.7.2 Reaktion des Gewebes auf Abriebpartikel

Derzeit sind die in der Literatur am häufigsten verwendeten Begriffe, um die Gewebereaktionen auf Abriebpartikel aus Endoprothesen zu umschreiben, die Begriffe ARMD („adverse reaction to metal debris“, zu deutsch „negative Reaktionen auf Metallabrieb“) und ALTR („adverse local tissue reaction“, zu deutsch „negative lokale

Gewebereaktionen“). Allerdings gibt es keine eindeutige, allgemein anerkannte Definition für diese Reaktionen²⁹.

Generell gilt, dass niedrige Reibung wenig, hohe Reibung jedoch viele Abriebpartikel hervorruft^{4,30}. Die Gleitflächen der Endoprothesen sind der Hauptbereich der Bildung von Abriebpartikeln. Diese werden in die Synovialflüssigkeit ausgeschüttet, von wo sie entweder durch Makrophagen in der Synovia oder durch die innere Zellschicht der Synovialmembran phagozytiert werden⁸.

Kein in den menschlichen Organismus implantiertes Biomaterial kann als biologisch inert bezeichnet werden, denn es erfolgt immer eine Einwirkung des Materials auf den Körper und umgekehrt. Abhängig von der chemischen Zusammensetzung des Materials kann es hierbei zu Abbau- und Korrosionsprodukten kommen²⁶.

Abriebpartikel von Implantaten und Ionen von Metallpartikeln rufen eine biologische Antwort hervor, welche zu periprotetischem Knochenverlust und aseptischer Lockerung führen¹⁵. Diese biologische Antwort ist in hohem Masse abhängig von den Eigenschaften der gebildeten Partikel wie deren Grösse, Form, Oberflächenbeschaffenheit und chemischer Zusammensetzung^{26,27}.

So können beispielsweise Nanopartikel, bei gleicher Masse an Partikeln pro Zelle, signifikant höhere Mengen an freien Superoxid- und Hydroxyl- Radikalen sowie signifikant höhere DNS- und Mitochondrialschäden hervorrufen als Mikropartikel. Grund dafür ist vor allem, dass sich Nanopartikel wesentlich schneller in Zell-Vakuolen auflösen oder korrodieren¹⁵.

Eine Verringerung der Anzahl an generierten Partikeln führt zu einer Verringerung von Entzündungsreaktionen²⁶, eine vollständige Vermeidung von Abriebpartikeln ist jedoch nicht möglich²⁶.

2.8 Materialpaarungen bei Gelenkendoprothesen

2.8.1 Grundlagen

Materialpaarungen von Gleitpartnern können generell in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen gibt es die Gruppe der „hart-auf-hart“ artikulierenden Gleitpaarungen, bei der beide Gleitpartner aus einem hochfesten Material bestehen, wie beispielsweise Metall und Keramik. Somit ergeben sich für hart-auf-hart artikulierende Gleitpaarungen die Kombinationen Metall-auf-Metall, Keramik-auf-Keramik sowie Keramik-auf-Metall.

Zum Anderen existiert die Gruppe der „hart-auf-weich“ artikulierenden Gleitpaarungen. Der eine Gleitpartner besteht hier aus einem vergleichsweise weichen Material wie zum Beispiel Polyethylen (UHMWPE für ultra-high-molecular-weight-polyethylen) und der andere aus einem der oben genannten harten Materialien. Somit ergeben sich für hart-auf-weich artikulierende Gleitpartner die Kombinationen Metall-auf-UHMWPE oder Keramik-auf-UHMWPE.

Von diesen Materialpaarungen ist die am häufigsten angewendete Paarung Metall-auf-Polyethylen (UHMWPE), wobei hier das Metall meist aus einer Kobalt-Chrom-Legierung besteht. Diese Gleitpaarung ist schon am längsten im Einsatz und im Vergleich zu anderen Materialpaarungen in der Herstellung am günstigsten. So sind beispielsweise Keramik-auf-Keramik Gleitpaarungen bis zu vier mal teurer als herkömmliche Kunststoff-auf-Kobalt-Chrom Gleitpaarungen^{4,18,23,24,26,31-34}.

2.8.2 Vor- und Nachteile verschiedener Gleitpaarungen anhand ausgewählter Beispiele

Der grösste Nachteil von hart-auf-weich artikulierenden Gleitpaarungen ist, dass in dieser Kombination der weiche Gleitpartner, also derjenige aus Polyethylen, einen enorm hohen Verschleiss erfährt und somit die Menge an Abrieb zum Teil ausserordentlich hoch ist²⁶. Dies führt deshalb meist schon nach wenigen Jahren zu deutlichen Gewebe- und Abstossungsreaktionen in Form von Granulomen und Osteolysen an der Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen⁴.

Metall-Abrieb ist in dieser Kombination nicht als problematisch aufgefallen, da hier der Verschleiss zum allergrössten Teil innerhalb des weichen Gleitpartners generiert wurde. Erst durch die Einführung von hart-auf-hart artikulierenden Gleitpaarungen traten die Auswirkungen des Metallabriebs in Erscheinung. Die hier generierten Partikel sind zu einem überwiegenden Teil Nanopartikel. Je kleiner ein Partikel ist, desto grösser ist seine Oberfläche in Relation zu seinem Volumen und desto grösser ist seine chemische Reaktivität in Bezug zum umliegenden Gewebe, was zusammen mit der Korrosionsanfälligkeit von Metalllegierungen eine Erklärung für die erhöhte Ionenkonzentrationen bei Metall-auf-Metall Endoprothesen ist⁸.

Aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität und ihrer guten tribologischen Eigenschaften werden in der Hüftendoprothetik immer häufiger Keramik-auf-Keramik Gleitpaarungen eingesetzt^{19,35}. Auch Polyethylen-auf-Keramik Gleitpaarungen werden immer beliebter,

da sie eine signifikant geringere Menge an Abriebvolumen als herkömmliche Metall-auf-Kunststoff Gleitpaarungen generieren³⁶.

2.9 Materialien in der Endoprothetik und deren spezifische Eigenschaften und Gewebereaktion

Die Hauptgründe für die Einführung neuer Materialien sind die bereits erwähnten Gewebereaktionen auf die konventionell eingesetzten Materialien Kobalt-Chrom sowie UHMWPE. So beschreiben Sonntag et al., dass Total-Gelenkendoprothesen, die Polyethylen als Gleitpartner verwenden, auf lange Sicht aufgrund der bereits erwähnten negativen Gewebereaktionen auf die grosse Menge von produzierten Abriebpartikeln nicht optimal funktionieren¹¹. Trotz allem sollte jedoch beachtet werden, dass der Grossteil der Patienten grundlegende Schmerzlinderung und Wiederherstellung der Funktionalität durch die derzeit verwendeten Endoprothesen-Materialien erhält. Deshalb müssen neue Materialien sorgfältig ausgewählt werden²⁶.

Der nachfolgende Abschnitt zeigt eine Übersicht über die gängigsten Materialien für Endoprothesen mit einem besonderen Fokus auf Kobalt-Chrom Legierungen und Siliziumnitrid.

2.9.1 Materialeigenschaften von Metallegierungen und deren Gewebereaktionen am Beispiel von Kobalt-Chrom-Legierungen (CoCr):

Kobalt-Chrom-Legierungen bieten eine Vielzahl an positiven mechanischen Eigenschaften, wie hohe Festigkeit, Härte und Elastizität¹¹. Gleitpaarungen aus Metall sind deshalb aus technologischer Sicht eine günstige Paarung in der Endoprothetik.

Bei Metallgleitpaarungen ist zwar das Abriebvolumen im Vergleich zu Polyethylen geringer, jedoch entstehen wesentlich mehr kleinere Partikel, häufig im Nanometerbereich (20-80 nm), die im Kreislauf transportiert werden und sich beispielsweise in Lymphknoten ablagern⁴. Diese Abriebpartikel sowie metallische Ionen sind vermutlich die Hauptursache für Pseudotumoren, Hypersensibilisierung⁶ und aseptische Lockerung mit Implantatversagen²⁵. Die Korrosion dieser Abriebpartikel erzeugt erhöhte Plasmaspiegel an Kobalt- und Chrom-Ionen im Blutserum und löst eine erworbenen Immunantwort aus²⁶, die eine wichtige Rolle beim vorzeitigen Versagen von Endoprothesen mit Metall-auf-Metall Gleitpaarungen^{37,38} spielt.

Nebenprodukte von Metall-Partikeln können, zusätzlich zu einer nicht-spezifischen, Makrophagen-medierten Immunantwort, Komplexe mit Serumproteinen bilden und so zu einer T-Lymphozyten medierten, spezifischen Immunantwort führen^{26,27}.

Sowohl Gewebse Nekrose als auch Makrophagen-Infiltration sind abhängig von der Menge an gebildetem Abrieb³⁸.

Mit der Menge an generierten Abriebpartikeln steigt das Risiko des Überschreitens des Grenzwertes für eine angeborene und erworbene Immunreaktion, wobei letztere sich durch eine sogenannte „aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesion“ (kurz ALVAL) klinisch manifestiert³⁸. So gibt es klare Anzeichen für eine erworbene immunologische Typ IV-Immunreaktion bei aseptischer Lockerung von Prothesen⁸.

Dies zeigte sich beispielsweise in einer Studie, in welcher bei 73 von 75 untersuchten Metall-auf-Metall Hüftendoprothesen ausgeprägte perivaskuläre lymphoide Infiltrate sowie Makrophagen-Reaktionen und in allen Fällen eine Gewebse Nekrose festgestellt wurde³⁸.

Metall-Partikel aus Kobalt-Chrom Legierungen bestehen zumeist aus Chromoxid (CrOx) oder Kobalt-Chrom (CoCr). Diese Partikel haben eine runde bis ovale Form und ihre Grösse liegt im Nanometer-Bereich⁶.

Je nach Grösse der Partikel kommt es zu unterschiedlichen biologischen Antworten¹⁵. Grosse Partikel können nicht phagozytiert werden und induzieren eine typische Fremdkörperreaktion mit einer lokalen Anhäufung von Makrophagen und Riesenzellen. Sind die Partikel klein, können sie von Makrophagen phagozytiert werden.

Beim Auftreten einer unspezifischen Immunantwort kommt es oft gleichzeitig zu einer spezifischen Immunantwort in Form einer Ansammlung und Aktivierung von Lymphozyten, wobei bisher ungeklärt ist, wie diese genau aktiviert werden. Diese rekrutieren wiederum Makrophagen.

Gleichzeitig wird die Infiltration von Makrophagen direkt durch die vorhandenen Metallpartikel über eine klassische Fremdkörperreaktion induziert. Bei der Phagozytierung von Metallpartikeln werden durch die Lysosomen der Makrophagen Metall-Ionen gebildet, die durch ihre hohe Konzentration innerhalb der Zelle zytotoxisch wirken. Dadurch kommt es zu einer Freigabe der Ionen ins umliegende Gewebe mit einer weiteren Schädigung anderer Zellen³⁸. Eine Verdickung der Synovialmembran durch Proliferation von Synovialgewebe und nachfolgender Gewebse Nekrose ist beispielsweise eine häufige Folge unspezifischer Immunreaktionen^{8,37}.

Verschieden Autoren vertreten die Meinung, dass eine Hypersensibilität gegenüber Metall generell sehr selten auftritt²⁹. Der häufigste metallische Sensibilisator beim Menschen, vor Kobalt und Chrom, stellt hierbei Nickel dar²⁵.

Jedoch liegt die Inzidenz einer Empfindlichkeit gegenüber Metall bei Patienten mit einer Metall-Endoprothese bei ca. 25%, also doppelt so hoch wie bei Menschen ohne Prothese. Bei Patienten mit vorzeitig versagender Prothese liegt sie sogar bei etwa 50-60%.

Dass eine Metall-Sensibilisierung in Verbindung mit Metall-auf-Metall sowie Metall-auf-Polyethylen Gleitpaarungen auftreten kann, ist deshalb die derzeitig vorherrschende Meinung.

In allen Fällen von Sensibilisierung gegen Metall ist das deutlichste histologische Merkmal die starke Erhöhung der Anzahl von Lymphozyten im umliegenden Gewebe⁸. Überempfindlichkeitsreaktionen im orthopädischen Bereich, wie Metallempfindlichkeit oder Metallallergie, werden deshalb als Spätreaktionen vom Typ IV bezeichnet^{25,39}. Sowohl Abrieb-Partikel als auch metallische Ionen sind vermutlich Gründe für negative Gewebereaktionen wie Pseudotumoren oder Übersensibilisierung⁵.

Unterschiede in der Partikelgrösse bewirken fundamental unterschiedliche biologische Antworten von humanen Zellen auf die jeweiligen Partikel¹⁴.

2.9.2 Materialeigenschaften von Keramiken und deren Gewebereaktionen am Beispiel von Siliziumnitrid (Si_3N_4)

Für den Einsatz in der Endoprothetik stehen verschiedene Arten von oxidierten Keramiken wie Zirkoniumdioxid und zirkoniumoxidverstärktes Aluminiumoxid (kurz ZTA) sowie Aluminiumoxid-Keramik in Form von Al_2O_3 zur Verfügung. Letztere ist die im Moment am häufigsten verwendete und in der Fachliteratur am häufigsten beschriebene Keramik in der Endoprothetik^{11,18,40}. Über Nicht-Oxid-Keramiken wie Siliziumnitrid (Si_3N_4) wurde bisher wenig publiziert.

Gleitpaarungen mit Si_3N_4 als alleinigem Material oder in Kombination mit Metall oder Kunststoff produzieren nur sehr wenig Abrieb und scheinen damit, auch im Hinblick auf sehr vorteilhafte tribologische Eigenschaften, ein gut geeignetes Material für künstliche Hüft- oder Kniegelenke zu sein^{4,16,31,42,43}.

Rasterelektronische Untersuchungen haben deutlich bessere Gleiteigenschaften von Keramik gegenüber Metall bewiesen⁴⁴.

Si₃N₄-Beschichtungen weisen eine höhere Härte auf als CoCr und liegen etwa im gleichen Bereich wie massives Si₃N₄^{31,32}.

Siliziumnitrid-Beschichtungen zeigen nach einer Einlaufphase einen stabilen Friktionskoeffizienten, welcher zwischen 0,2 - 0,3 bei 10.000 Wiederholungen im sogenannten „ball-on-disc“-Test liegt.

Der Elastizitätsmodul von Si₃N₄ gleicht dem von CoCr³¹.

Die spezifische Abriebrate von massivem Si₃N₄ liegt bei etwa $1 \times 10^{-7} \text{ mm}^3/\text{Nm}$, die von Si_xN_y- Beschichtungen bei etwa $3 \times 10^{-7} \text{ mm}^3/\text{Nm}$.

CoCr im Vergleich zeigt eine Abriebmenge von etwa $60 \times 10^{-7} \text{ mm}^3/\text{Nm}$, was somit der 20- bis 60-fachen Menge an Abriebvolumen herkömmlicher Kobalt/Chrom-Legierungen gegenüber Si₃N₄ entspricht³². Si₃N₄- Gleitflächen, welche mit sich selbst oder mit CoCr als Gleitpartner artikulierte, produzierten so, extrapoliert auf 10 Millionen Zyklen im Hüft-Simulator, Abriebvolumen von 0,65mm³ bzw. 0,47 mm³, verglichen mit einem Abriebvolumen von CoCr mit sich selbst von 6,5 mm³ sowie CoCr-Gleitflächen mit Gleitpartnern aus Polyethylen (UHMWPE) mit einem Abriebvolumen von 62 mm^{3,42}.

Mechanische Tests zeigten eine hohe Biegefestigkeit, Bruchfestigkeit, gute Ergebnisse im Weibull-Modul, (welches als das „Konzept des Versagens aufgrund des schwächsten Gliedes“ das Ausmass von Gefüge-Inhomogenitäten darstellt), sowie eine gute Resistenz gegenüber hydrothermischem Abbau⁴².

Siliziumnitrid zeigt unter tribologischen Gesichtspunkten ein besseres mechanisches Verhalten als Aluminiumoxid-Keramiken, welche derzeit am häufigsten in Total-Hüftendoprothesen genutzt wird. Dies ist vorteilhaft in Hinblick auf den Sicherheitsfaktor von Implantationsmaterialien⁴⁵.

Da Si₃N₄ eine höhere Bruchfestigkeit aufweist als Al₂O₃, ist es resistenter gegenüber dem Auftreten und der Ausbreitung von Mikrorissen, die wiederum zu Sprödigkeits-Brüchen führen können⁴².

Ausserdem zeigen Siliziumnitrid-Keramiken, im Vergleich mit Oxid-Keramiken (Aluminiumoxid und Zirkoniumoxid), eine höhere Oberflächenbenetzbarkeit mit wässrigen Medien, was die Gleitreibung herabsetzt.

Weiterhin weisen Siliziumnitrid-Keramiken einen sehr niedrigen Friktions-Koeffizienten bei gleichzeitig minimaler Oberflächenabnutzung durch Gleitreibung auf. Aus diesen Gründen eignen sich Siliziumnitrid-Keramiken sehr gut für den Einsatz als Gleitpartner in Endoprothesen³⁵.

Einen Nachteil von Pfannen aus massiven Keramiken stellt bisher jedoch deren Bruchgefahr dar, da Keramik in massiver Form eine sehr hohe Sprödigkeit aufweist^{4,31}. Weiterhin muss die Adhäsion, also die Haftung von Si_3N_4 -Beschichtungen an deren metallischem Untergrund (CoCr) verbessert werden. So zeigten so genannte „Ritz-Tests“ von Siliziumnitrid-Beschichtungen auf metallischem (CoCr) Untergrund eine Delaminierung, d.h. ein Abplatzen der Si_3N_4 -Beschichtung schon bei geringer (<1 N) Belastung³².

Auf der anderen Seite hat die Beschichtung einer Kobalt-Chrom Prothese mit Siliziumnitrid den grossen Vorteil einer Redundanz: Sollte die Beschichtung abgetragen werden oder abplatzen, so sollte der freigelegte Untergrund aus CoCr die Funktionalität der Prothese aufrecht erhalten können, da CoCr selbst ein gängiges Material für den Einsatz als Gleitfläche von Prothesen darstellt³². Ein weiterer Vorteil von Keramikbeschichtungen auf Metall ist die hohe mechanische Resistenz durch die Kombination eines zähplastischen, also dehnbaren, Untergrundes in Verbindung mit einer harten, abriebbeständigen Oberfläche³².

Weiterhin machen seine hohe Resistenz gegen Abrieb und seine Fähigkeit, Zellwachstum und –metabolismus zu unterstützen, Si_3N_4 zu einem attraktiven Kandidaten für die orthopädische Chirurgie. Siliziumnitrid kann unter anderem auch dazu benutzt werden, orthopädische Implantate mit einer glatten, artikulierenden Gleitfläche auf der einen und einer porösen Fläche für den Knocheneinwuchs auf der anderen Seite innerhalb einer Implantatkomponente herzustellen⁴¹. So wurden in unmittelbarer Nähe von Siliziumnitrid-Implantaten Osteone gefunden, die in experimentellen Studien während der gesamten Implantationszeit darstellbar waren⁴⁰.

Von Keramikgleitpartnern generierter Abrieb fällt in signifikant geringerem Masse an als bei Kunststoff-auf-Metall- oder Metall-auf-Metall- Gleitpaarungen.

Trotzdem zeigen sich auch hier klinisch relevante biologische Reaktionen, einschliesslich granulomatöser Entzündungen im periprothetischen Gewebe²⁶.

Auf der anderen Seite zeigt sich ein geringeres Mass an Osteolyse. Ob dies auf das geringere Volumen des gebildeten Abriebes oder auf das Material selbst zurückzuführen ist, ist bisher nicht vollständig geklärt²⁶.

2.9.3 Materialeigenschaften von Kunststoffen und deren Gewebereaktionen

Die Einführung von ultra-hochmolekulargewichtigem Polyethylen (UHMWPE) kann als Meilenstein im Einsatz neuer Materialien in der Endoprothetik gewertet werden. Dieses Material wird als Gleitpartner in Kombination mit Kobalt-Chrom, Al_2O_3 sowie Si_3N_4 in hart-auf-weich artikulierenden Gleitpaarungen eingesetzt und stellt die am häufigsten eingesetzte Kombination für Total-Hüftgelenkendoprothesen dar^{4,24,26,31,32}.

UHMWPE zeichnet sich durch eine Vielzahl von positiven tribologischen Eigenschaften aus und ist aufgrund der jahrzehntelangen Erfahrungen mit diesem Material sowie wegen seines geringen Preises immer noch weit verbreitet im Einsatz^{23,33}.

Dabei verursacht der Polyethylen-Abrieb jedoch meist schon nach wenigen Jahren schwerwiegende Gewebereaktionen wie Granulome und Osteolysen⁴.

Aus diesem Grund werden seit einigen Jahren verbesserte Varianten von UHMWPE entwickelt und eingesetzt. Diese werden als hochvernetztes bzw. kreuzvernetztes UHMWPE oder kurz XUHMWPE bezeichnet und zeichnen sich durch bessere tribologische Eigenschaften mit geringerem Abriebvolumen aus⁴.

XUHMWPE ist im Moment das Material der Wahl für Gleitflächen von Totalhüftendoprothesen²⁹.

In einer internationalen Studie, in welcher 16.571 primäre Totalhüftendoprothesen aus UHMWPE und XUHMWPE verglichen wurden, konnte allerdings kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Risikos eines vorzeitigen Implantatversagens zwischen den beiden Materialgruppen nachgewiesen werden⁴⁶.

Im Vergleich zu Metalllegierungen scheinen Polyethylen-Partikel hauptsächlich eine nicht-spezifische, Makrophagen-medierte Immunantwort auszulösen²⁷.

Polyethylen ist biologisch inert und kann nicht durch Phagozytose abgebaut werden. Dies bedeutet, dass die gebildeten Abriebpartikel im μm - und nm -Bereich im Körper akkumulieren. Ablagerungen von (X)UHMWPE-Partikeln konnten in Lymphknoten, Milz und Leber nachgewiesen werden. Partikel in der Größenordnung von 0,1-0,2 μm sind die biologisch aktivsten Partikel und rufen die stärksten negativen Gewebereaktionen hervor. Das osteolytische Potential von UHMWPE ist abhängig von der Partikelgröße und dem Gesamtvolumen an Partikelabrieb³³.

2.9.4 Resorbierbare Abriebpartikel

Die Generierung von Abriebpartikeln aus Endoprothesen kann zwar durch neue Materialien und technische Verbesserungen reduziert, aber nie ganz vermieden werden. Ein neuer Lösungsansatz für diese Problematik sind Materialien, die resorbierbare Partikel generieren, welche im Gewebe dissoziieren und dann ausgeschieden werden können, ohne gewebetoxisch zu wirken.

Seit der Verwendung von Si_3N_4 wurden mehrere Studien veröffentlicht, die die Resorbierbarkeit von Siliziumnitrid in vivo sowie in Serum, Magensaft und synthetischen, biochemischen Medien mit einem pH von 7,4 belegen.

So legen die guten tribologischen Eigenschaften von Si_3N_4 in Kombination mit dessen Fähigkeit, in PBS und polaren Lösungen zu dissoziieren nahe, dass solche Beschichtungen das Potential haben, ein frühzeitiges Implantatversagen zu verhindern^{31,32,43}.

Der „Ball-on-disc-Test“ mit Si_3N_4 in bovinem Serum als Gleitmittel zeigte zudem die Bildung von Biofilmen sowohl auf Si_3N_4 als auch auf CoCr. Diese Biofilme bestehen aus Metalloxiden/-hydroxiden gemischt mit Proteinfragmenten aus dem Serum und sind in der Lage, die tribokorrosiven und biologischen Eigenschaften der verwendeten Materialien zu verbessern, indem sie unter anderem die Gleitfähigkeit dieser Materialien erhöhen⁴³.

Der Nachweis der Resorbierbarkeit eines Materials sowie der Fähigkeit des Organismus, die resultierenden Abbauprodukte dieses Materials auszuschcheiden, ohne dass diese Abbauprodukte den Organismus in irgendeiner Weise schädigen, würde einen Meilenstein in der Entwicklung von Materialien in der Endoprothetik bedeuten, da dies eine Minimierung der Problematik von Fremdkörperreaktionen durch Abriebpartikel bedeuten und somit die Biokompatibilität dieser Materialien erheblich steigern würde.

2.10 Biokompatibilität

Die Definition der Biokompatibilität war in den 1970er Jahren die, dass die eingesetzten Materialien im Gewebe möglichst nicht reagieren und damit im Patienten keinen Schaden hervorrufen dürfen bzw. dass dieser Schaden so gering wie möglich auszufallen hat⁴¹.

1987, parallel zur Entwicklung resorbierbarer Biomaterialien, wurde die Biokompatibilität neu definiert als Fähigkeit eines Materials, in einer spezifischen Situation in einer angemessenen Weise mit dem Wirtsorganismus zu interagieren.

Diese Neudefinition basiert auf drei Grundsätzen: Das eingesetzte Material soll innerhalb des Körpers mit diesem (aktiv) interagieren und nicht einfach nur (passiv) existieren. Die Reaktion, die das entsprechende Material durch seine Interaktion mit dem Gewebe hervorruft, soll dem Zweck der Anwendung angemessen sein. Diese Angemessenheit kann je nach Situation und Zweck der Anwendung variieren.

Der Schlüssel für das Verständnis von Biokompatibilität liegt somit in der Erkenntnis, wie und wann chemische, biochemische, physikalische, physiologische und andere Wirkungsmechanismen durch den Kontakt von Material mit dem Wirtsgewebe aktiv werden, sowie was die Konsequenzen dieser Wirkungsmechanismen sind.

So sollten Knochenimplantate eine möglichst gute Verbindung zum umgebenden Knochen aufweisen und möglichst wenig Korrosions- oder Abbauprodukte abgeben. Zusätzlich muss die Menge und das Volumen an Abriebpartikeln und die Gewebereaktionen auf diese Produkte und Partikel minimiert werden. Ausserdem muss die biomechanische Umgebung von Knochen und umgebendem Weichteilgewebe optimiert werden, um Beeinträchtigungen der Homöostase in diesem Bereich zu minimieren⁴⁷⁻⁵⁰.

Heutzutage wird die Definition der Biokompatibilität wieder diskutiert, da die im Jahre 1987 etablierte Definition heute nicht mehr ausreichend ist. So werden viele Materialien, welche der bisherigen Definition entsprechen, vom Wirtsorganismus, in welchen sie eingebracht werden, einer geringen, aber deutlich wahrnehmbaren Abkapselungsreaktion in Form einer Kollagenschicht unterliegen, welche sich um das jeweilige Material bildet. Dies bedeutet eine klassische Fremdkörperreaktion und dies wiederum steht im Widerspruch der Bedeutung der Biokompatibilität im herkömmlichen Sinn.

Auf der anderen Seite gibt es heutzutage tatsächlich Materialien, welche vom Körper integriert werden und in welche Gefässeinsprossung und ein Einwachsen von Gewebe beabsichtigt ist und auch nachgewiesen werden kann. Auch diese Materialien werden der Definition von 1987 zugeordnet, obwohl sie eine komplett andere Reaktion des Wirtsorganismus hervorrufen.

Aus diesem Grund fordern Forscher wie Ratner und Williams, eine ganz neue Definition des Begriffes Biokompatibilität.

So ist für Ratner die Biokompatibilität „die Fähigkeit eines Materials, normale Wundheilung, Rekonstruktion und Gewebeintegration lokal zu fördern und zu steuern“⁴⁹.

Für Williams gibt es ein biokompatibles Material per definitionem nicht⁴⁸. Sein Vorschlag ist, den Begriff „biokompatibles Material“ zu ersetzen durch z.B. „biokompatibles System“ oder noch genauer durch „in-sich biokompatibles System“. Für Williams bezieht sich die Biokompatibilität eines medizinischen Langzeit-Implantates auf die Fähigkeit dieses Implantates, seine gewünschte Funktion mit dem gewünschten Grad an Inkorporation in den Organismus des Trägers zu erfüllen, ohne dabei unerwünschte lokale oder systemische Effekte im Träger hervorzurufen⁵⁰.

Nach beiden Definitionen kann Siliziumnitrid als biokompatibel angesehen werden, da auf Siliziumnitrid-Implantatoberflächen regelmässig kalzifiziertes Knochengewebe nachgewiesen werden konnte, sowie über die gesamte Implantationszeit keine negativen Gewebereaktionen in der Nähe des Implantates auftraten⁴⁰ und in-vitro Modelle in Fibroblasten-Zellkulturen (L929 Zelllinien-Modell)⁵¹ zeigten, dass sich während des Einsatzes von Si₃N₄-Keramiken keinerlei Hinweise auf zytotoxische Eigenschaften ergaben. Neue Belege zeigen, dass Si₃N₄-Keramiken ein günstiges Biokompatibilitäts-Profil aufweisen. So sind Siliziumnitrid-Keramiken nicht nur nicht toxisch, sondern können auch die Zell-Adhäsion sowie die Zellproliferation und Differenzierung positiv beeinflussen⁴¹.

2.11 Tiermodell

2.11.1 In-vivo Tiermodell

In der Schweiz wie auch in der Europäischen Union gilt für Forscher, welche planen, Versuche an lebenden Tieren durchzuführen, das sogenannte „3R-Prinzip“, welches schon 1959 durch die Forscher Russell und Burch aufgestellt wurde. Hierbei steht „3R“ für „Replacement, Reduction, Refinement“. Für den Forscher bedeutet dies, die Unerlässlichkeit des Einsatzes von lebenden Tieren für die Erreichbarkeit des Forschungszieles zu prüfen und zu beweisen. Konkret heisst das, dass der Antragsteller den Mangel an geeigneten Alternativmethoden für den Einsatz von lebenden Tieren sowie das Fehlen von schon vorhandenen Ergebnissen vorangegangener, vergleichbarer Tierversuche nachzuweisen hat, sowie die Anzahl der eingesetzten Tiere auf ein

Minimum zu beschränken ist. Unerlässliche Tierversuche im Sinne der Tiere sind so schonend wie möglich durchzuführen, um ein unangebracht hohes Mass an Leiden der Tiere zu verhindern.

Erst wenn diese Kriterien erfüllt und nachgewiesen sind, kann ein Antrag auf Durchführung eines Tierversuches von der zuständigen Behörde genehmigt werden^{52,53}. In der vorliegenden Studie wurden die Kriterien des 3R-Prinzips erfüllt und nach Prüfung durch die autorisierende Behörde (Kantonales Veterinäramt Zürich) die Bewilligung für die Durchführung des Tierversuches erteilt.

Die Unumgänglichkeit des Einsatzes von lebenden Tieren in der vorliegenden Studie ergibt sich aus deren Fragestellung.

Konkret sollen in dieser Studie unter anderem die Fragen nach der möglichen systemischen Verteilung der eingesetzten Substanzen im Organismus, sowie eine mögliche systemische Auswirkung dieser Substanzen auf den Organismus geprüft werden.

Da die komplexen und ineinandergreifenden Prozesse eines hochentwickelten Säugetierorganismus wie dem des Menschen nicht durch einen alternativen ex-vivo Versuchsaufbau nachempfunden bzw. simuliert werden können, ist der Einsatz von lebenden Tieren in diesem Fall alternativlos⁵⁴.

Die Ratte ist eine passende Spezies für diesen Versuchsaufbau, denn ihre Grösse erlaubt intra-artikuläre Injektionen sowie die Gewinnung ausreichender Mengen an Material um histologische Analysen durchzuführen⁵⁵.

2.11.2 Lokalisation der Applikation

Die Injektion der Test- bzw. Referenzsubstanz erfolgte in das Kniegelenk, da es für intraartikuläre Injektionen sowie für adspektorische und palpatorische Untersuchungen durch seine exponierte anatomische Lage sehr gut geeignet ist. Für die Fragestellung dieser Studie hinsichtlich Biokompatibilität, Verteilung und Resorbierbarkeit von Abriebpartikeln kann das Kniegelenk stellvertretend für andere Gelenke, in welche Endoprothesen implantiert werden können, herangezogen werden.

Des Weiteren ist die Injektion von Substanzen wie z.B. von Abriebpartikeln aus Endoprothesen^{56,57}, Lokalanästhetika⁵⁸ oder anderer Substanzen^{59,60} in das Kniegelenk von Ratten hinlänglich in der Literatur beschrieben, wodurch diese Applikationsform einen gut etablierten Versuchsaufbau darstellt.

2.11.3 Die Ratte als Versuchstier

Untersuchungen haben ergeben, dass junge, adulte Wistar-Rattenstämme praktisch frei von degenerativen Knorpeldefekten sind⁵⁵. Dies ist für die Vergleichbarkeit der Resultate dieser Studie von grundlegender Bedeutung, da falschpositive histopathologische Befunde minimiert werden können.

In der vorliegenden Studie wurden 72 männliche, adulte Ratten vom Stamm RCC Han Wistar ausgewählt und für die eigenen Untersuchungen 48 Tiere eingesetzt. Die Ratten eignen sich aufgrund ihrer Genetik und der guten Vergleichbarkeit mit etablierten Studien gut für die Forschung im orthopädischen Bereich^{67,68}. Generell werden in diesem Bereich häufig Nager eingesetzt. Zum einen aus Kostengründen, zum anderen ist die genetische Variabilität von Ratten und Mäusen deutlich geringer als in grösseren Säugetierspezies⁶⁶.

Ein weiterer Punkt ist der ethische Aspekt. So sind Nagetiere, schon allein durch ihre von Natur aus kürzere Lebenszeit sowie der Möglichkeit, sie trotz relativ geringem Platzaufwand artgerecht halten und betreuen zu können, als Versuchstiere in Bezug auf tierschutzrelevante Gesichtspunkte grösseren und höher entwickelten Spezies vorzuziehen.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Für diese Studie wurden insgesamt 72 männliche Auszuchttratten vom Stamm RCC Han Wistar eingesetzt und 48 Tiere für diesen Teil der Untersuchungen verwendet. Lieferant der Tiere war die Firma Harlan Laboratories, B.V., Venray, Kreuzelweg 53, 5961 NM Horst, Niederlande. Das Gewicht der Tiere lag zum Lieferzeitpunkt im Durchschnitt bei 298,35 g (286g-362g). Das Alter der Tiere lag im Mittel bei etwa 11 Wochen (9-12 Wochen).

Dieser Tierversuch wurde vom kantonalen Veterinäramt Zürich bewilligt unter der Bewilligungsnummer 133/2014 und unter den Vorgaben und Richtlinien des schweizerischen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die Studie wurde unter Bedingungen der „Good Laboratory Practice“ (GLP) durchgeführt.

3.2 Aufbau der Studie

Die 72 Tiere wurden in 3 Gruppen von jeweils 24 Tieren unterteilt. Den Tieren der ersten Gruppe wurde die Test-Substanz (Si_3N_4) injiziert, denen der zweite Gruppe die Referenz-Substanz 1 (CoCr) und denen der dritte Gruppe die Referenz-Substanz 2 (Titanium). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Auswertung der ersten beiden Gruppen (n=48 Tiere).

Beide Gruppen (jeweils n = 24 Tiere) wurde jeweils in 2 Untergruppen unterteilt (n = 12 Tiere), wobei die Tiere der einen Gruppe 7 Tage, die Tiere der zweiten Gruppe 2 Tage nach der Operation euthanasiert wurden.

Jede dieser 4 Gruppen (n = 12 Tiere) wurde nochmals unterteilt in je 1 Gruppe (n= 6 Tiere), welche das entsprechende Item in geringer Dosierung und je 1 Gruppe (n= 6 Tiere), welche das entsprechende Item in hoher Dosierung verabreicht bekamen (siehe Tabelle 3.2/1).

Die 8 Gruppen zu je sechs Tieren unterschieden sich also in der Art des verabreichten Stoffes, dessen Dosierung sowie bezüglich des postoperativen Überlebenszeitraumes. Die Zuordnung der Tiere zu den verschiedenen Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Die jeweilige Substanz wurde unter sterilen Bedingungen in Vollnarkose mittels einer speziellen, auf µl-exakten Spritzen-/Kanülen-Kombination in das rechte Kniegelenk appliziert.

Das linke Kniegelenk wurde nicht behandelt und diente als Negativkontrolle.

Nach Ablauf der vorgegebenen postoperativen Überlebensphase wurden die Tiere mittels CO₂-Inhalation euthanasiert und direkt im Anschluss in einer Kühlbox zur Probenentnahme in das Labor der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich verbracht.

Die gewonnenen Proben wurden daraufhin histologisch und immunhistochemisch aufbereitet und evaluiert.

Gruppe	Substanz	Dosis	Applikationsweg	Euthanasie (Tage nach Eingriff)	Anzahl Tiere
1	Referenz- Substanz 1 “R” (CoCr)	Niedrig	Intraartikulär (Kniegelenk)	2	6
2				7	6
3		Hoch		2	6
4				7	6
5	Test- Substanz “T” (Si ₃ N ₄)	Niedrig		2	6
6				7	6
7		Hoch		2	6
8				7	6
Total					48

Tab. 3.2/1: Gruppeneinteilung der verwendeten Versuchstiere (Gruppe Referenz- Substanz 2 nicht aufgeführt)

3.3 Materialien

3.3.1 Referenz-Substanz (R)

Als Referenz-Substanz wurde in dieser Studie eine Lösung mit Mikropartikeln einer Cobalt-Chrom Legierung (CoCr) verwendet, wie sie auch in gängigen Endoprothesen aus Cobalt-Chrom generiert werden. Das Material (Lot-Nr.: 160115) wurde vom Projektpartner (School of Mechanical Engineering, University of Leeds, Grossbritannien) hergestellt und in Form von je zwei hoch konzentrierten

Stammlösungen mit der Lieferanten-Bezeichnung 300115160115 HC1 (im Folgenden nur noch HC1 genannt) sowie 300115160115 HC2 (im Folgenden nur noch HC2 genannt) sowie zwei niedrig konzentrierten Lösungen mit der Lieferanten-Bezeichnung 300115160115 LC1 (im Folgenden nur noch LC1) und 300115160115 LC2 (im Folgenden nur noch LC2 genannt) in Volumina zu jeweils 0,5 ml (500µl) zur Verfügung gestellt.

Jede sterile Stammlösung wurde in 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes® geliefert und bis zur weiteren Verarbeitung (Aliquotierung) bei einer Umgebungstemperatur von -18°C an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Raum TFA 00.05 gelagert. Die Konzentration an CoCr in der hochkonzentrierten Stammlösung betrug 14,994 mg/ml, die Konzentration an CoCr in der niedrig konzentrierten Stammlösung betrug 4,998 mg/ml. Die Partikel hatten eine Grösse von 100nm – 20µm.

3.3.2 Test-Substanz (T): Siliziumnitrid (Si₃N₄)

Das in dieser Studie getestete Material war Siliziumnitrid (Summenformel Si₃N₄), welches zur Klasse der Nichtoxid-Keramiken zählt. Wie das Referenz-Material wurde auch das Test-Material vom Projektpartner zur Verfügung gestellt, der das Material von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, Industriestrasse 25, 9470 Buchs SG (Lot-Nr.: MKBR4359V, Katalognummer: 636703, CAS-Nummer: 12033-89-5, MDL-Nummer: MFCD00011230, PubChem Substanz ID: 24882797) bezog.

Das Test-Material wurde in Form von je zwei hochkonzentrierten Stammlösungen mit der Lieferanten-Bezeichnung 300115MKBR4359V HS1 (im Folgenden nur noch HS1) und 300115MKBR4359V HS2 (im Folgenden nur noch HS2 genannt) sowie zwei niedrig konzentrierten Stammlösungen mit den Bezeichnungen 300115MKBR4359V LS1 (kurz LS1) sowie 300115 MKBR4359V LS2 (kurz LS2) in sterilen, 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes® geliefert und wie das Referenz-Material bis zur weiteren Verarbeitung (Aliquotierung) in einem Tiefkühler (Liebherr; Modell: 0906950-04; Serien-Nr.:44.485.9431) bei einer Umgebungstemperatur von -18°C an der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, Raum TFA 00.05, gelagert.

Die Benennung der Stammlösungen sowohl der Test-Substanz als auch der Referenz-Substanz folgte einem Schlüssel. Hierbei bezeichneten die ersten sechs Zeichen des Probennamens das Herstellungsdatum, die nachfolgenden neun Zeichen die LOT-

Nummer, das drittletzte Zeichen die Konzentration, das vorletzte Zeichen den betreffenden Stoff und das letzte Zeichen die Probennummer.

Die Stammlösungen bestanden aus 500µl steriler PBS, in der das Test-Material in Pulverform gelöst war. Die Konzentration an Siliziumnitrid-Nanopartikeln in den hochkonzentrierten Stammlösungen betrug 6,192 mg/ml, in den niedrig dosierten Stammlösungen lag die Konzentration bei 2,064 mg/ml.

Das Pulver bestand aus Si_3N_4 -Partikeln in der Grösse von 15nm - 95nm, wobei die durchschnittliche Grösse zwischen 30nm und 40nm lag (siehe Abb. 3.3.2/1: Grössenverteilung SiN Partikel).

Die von der Firma Aldrich hergestellten Modell-Siliziumnitrid-Partikel wurden an der University of Leeds mittels hochauflösendem Rasterelektronenmikroskop (FEG-SEM, siehe Abb. 3.3.2/2-5) sowie des NanoparticleTrackingAnalyse-Verfahrens (NTA-Verfahren) hinsichtlich Ihrer Grössenverteilung und morphologischen Beschaffenheit mit Siliziumnitrid-Partikeln verglichen, welche durch ein so genanntes „pin-on-disc“-Abriebverfahren aus Si_3N_4 -Beschichtungen generiert wurden. Hierbei wurden die Si_3N_4 -Partikel aus dem verwendeten salzhaltigen Schmierfilm des Abriebverfahrens mittels Filterung und anschliessender vierstündiger Trocknung mittels Infrarotlampen und Beschichtung der Filter mit einer 3-5 nm Platin/Palladium-Schicht zurückgewonnen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass beide Gruppen von Siliziumnitrid-Nanopartikeln in Form, Oberflächenbeschaffenheit und Grösse sowie der Tendenz zur Verklumpung und Aggregatbildung vergleichbar waren und sich die Modell - Nanopartikel der Firma Aldrich damit als Referenz- Material für unsere Studie eigneten.

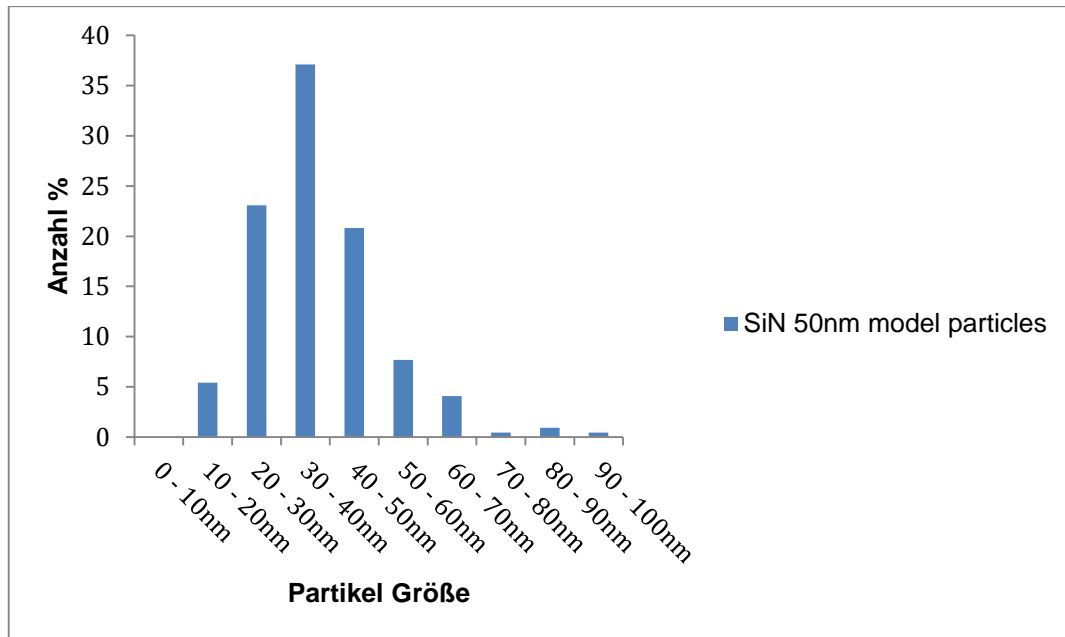


Abb. 3.3.2/1: Größenverteilung von SiN-Partikeln

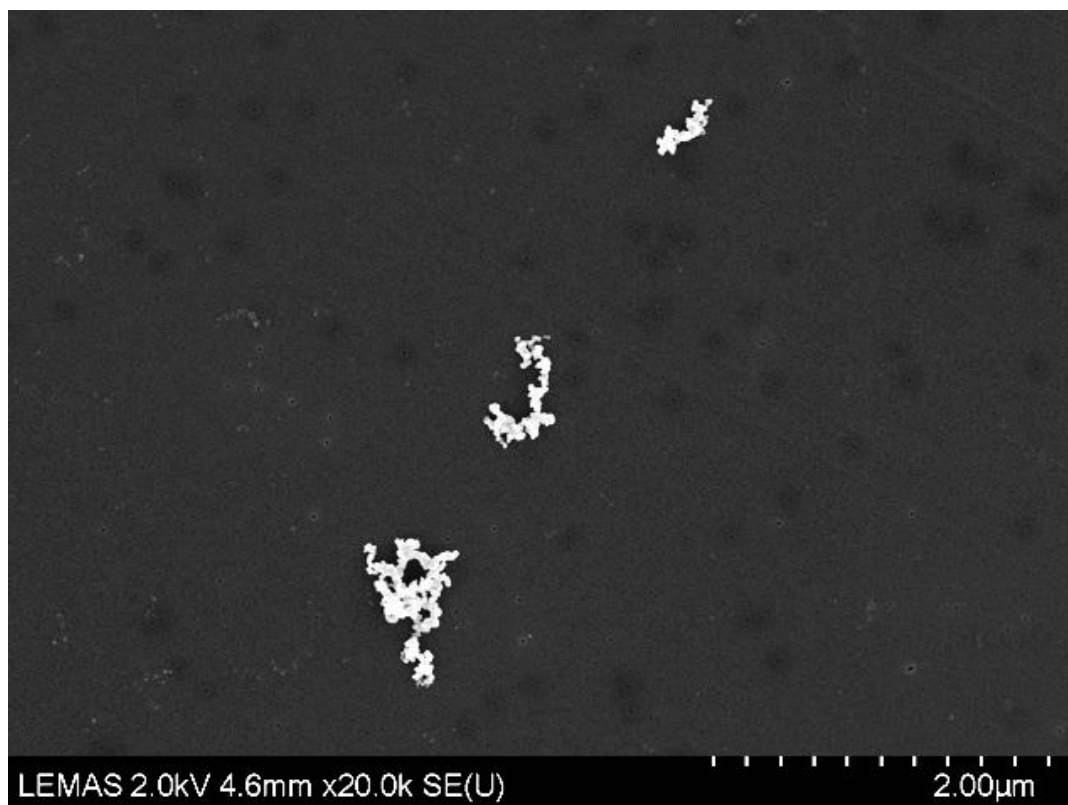


Abb. 3.3.2/2: FEG-SEM (Niederenergie/ hochauflösende) Aufnahme von Modell Si_3N_4 Partikeln

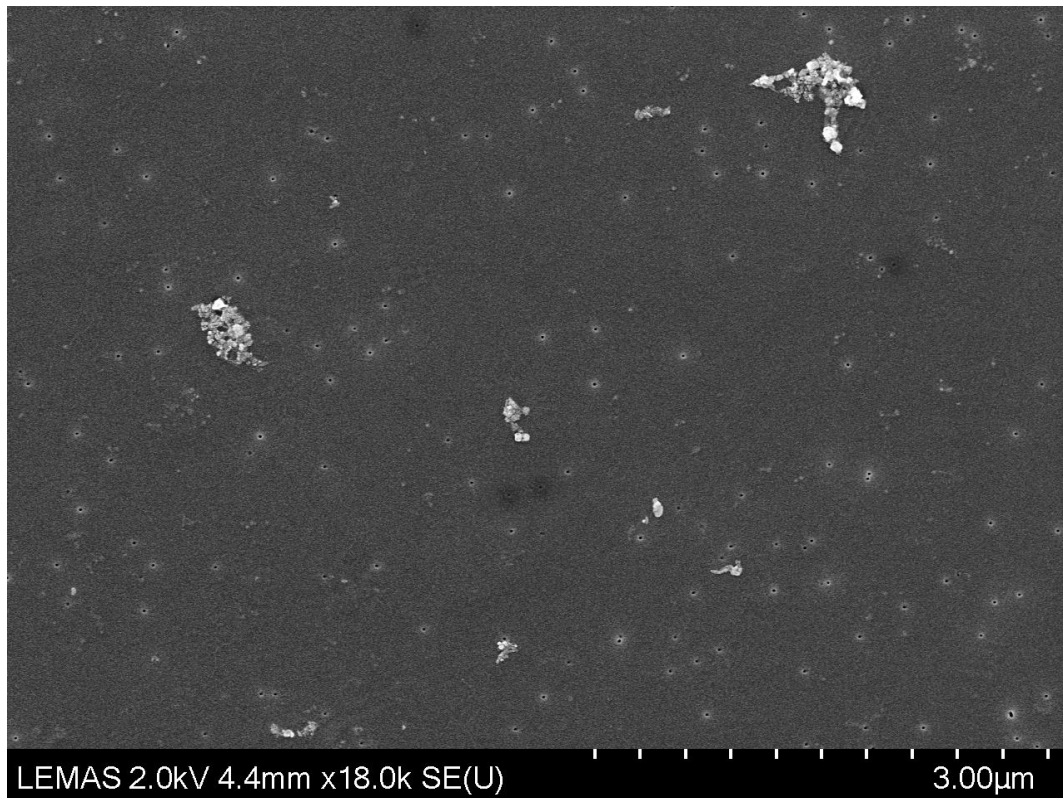


Abb. 3.3.2/3: FEG-SEM (Niederenergie/ hochauflösende) Aufnahme von Si_3N_4 Partikeln, die durch „pin-on-disc“-Abrieb generiert wurden

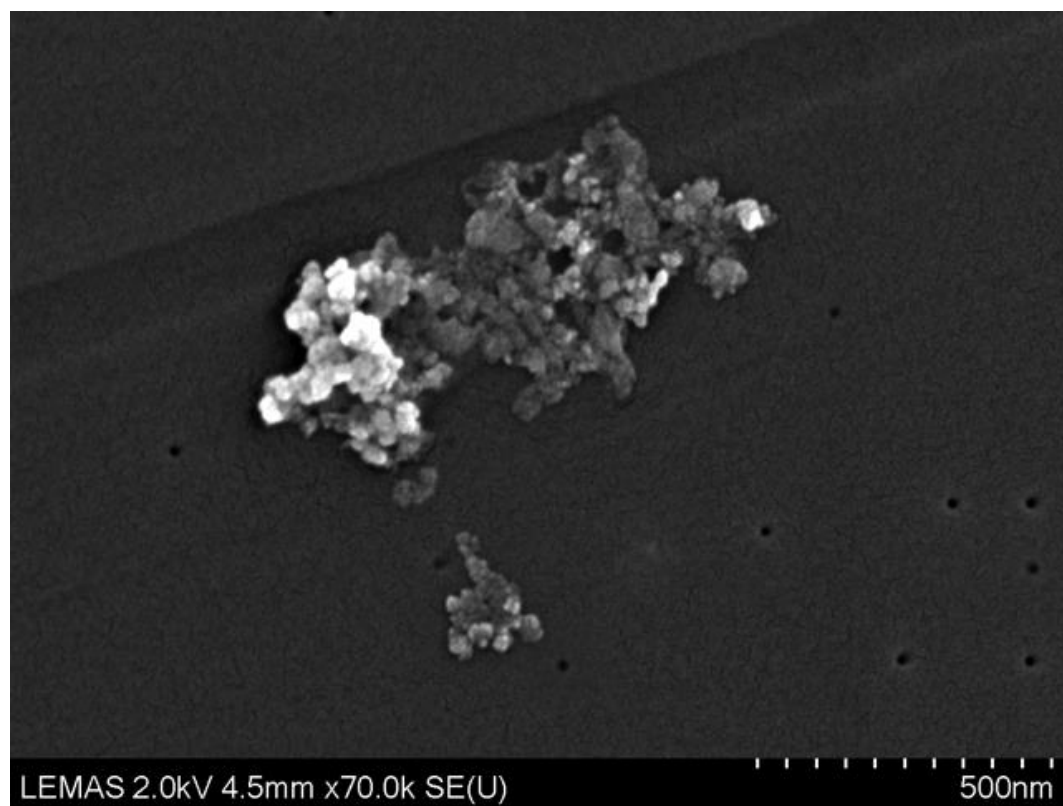


Abb. 3.3.2/4: FEG-SEM (Niederenergie/ hochauflösende) Aufnahme von Modell Si_3N_4 Partikeln

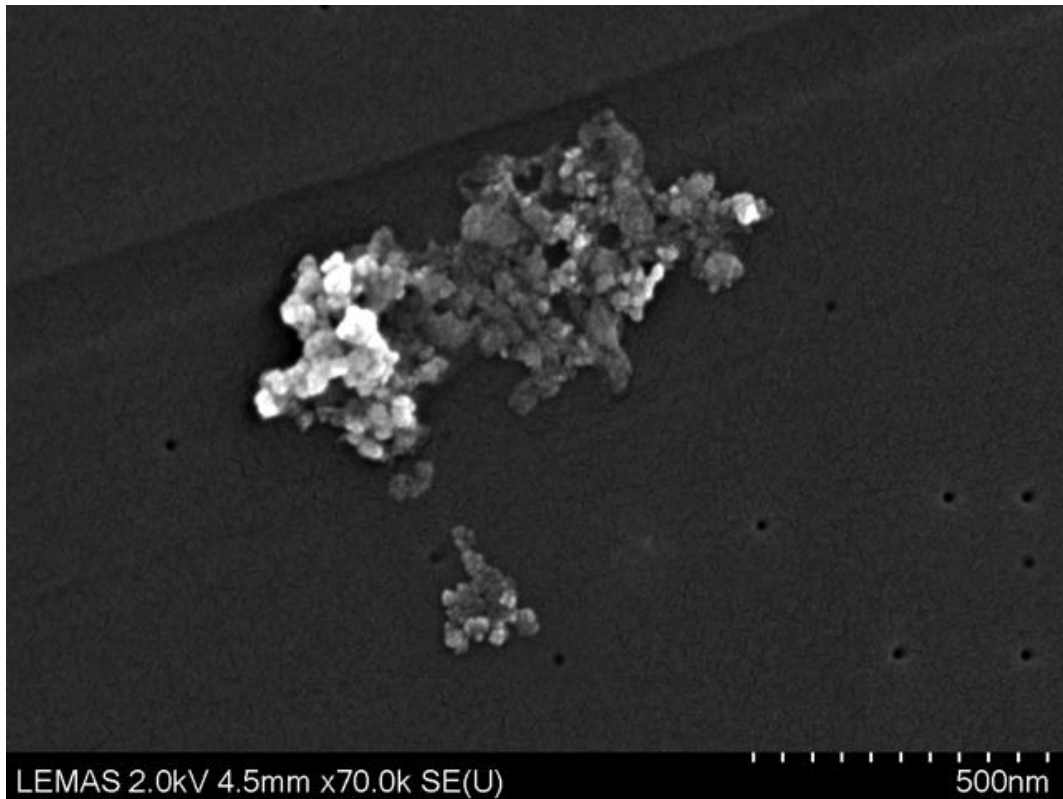


Abb. 3.3.2/5: FEG-SEM (Niederenergie/ hochauflösende) Aufnahme von Si_3N_4 Partikeln, welche durch „Pin-on-Disc“-Abrieb generiert wurden

3.3.3 Verdünnung der Stammlösungen

Die Stammlösungen mussten vor der Verwendung als Injektionslösung auf eine Konzentration verdünnt werden, die dem Abriebvolumen von 2-4 mm³ (niedrige Konzentration) bzw. 6-12 mm³ (hohe Konzentration) in einem 70 kg schweren Menschen entspricht. Das Verdünnungsverfahren entsprach einer Arbeitsanweisung des Projektpartners und war für alle Stammlösungen gleich. Diese wurden etwa eine Stunde vor Beginn der Verdünnung bei Raumtemperatur aufgetaut. Um die Lösungen zu homogenisieren, wurden die Proben (Volumen 0,5 ml pro 1,5 ml Eppendorf -tube®) auf einem Vortex Mischer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Model- Nr.: G-560 E, Serien-Nr.: 2E-171929) für 20 s auf Intensitäts-Stufe 10 (maximale Stärke) gerüttelt. Im nächsten Schritt wurde die aufgeschüttelte Probe mehrere Sekunden mit geringer Umdrehungszahl zentrifugiert (Gerät: Kinetic Energy 26 Joules Galaxy Mini Centrifuge, VWR International, Serien-Nr.: 13060669) um Flüssigkeit, die sich eventuell innen am Deckel des Eppendorf-tubes® abgelagert haben könnte, abzulösen. Direkt anschliessend wurde das Probengefäss in einer Sicherheitswerkbank (Gerätebezeichnung: HERAsafe KS 15®, Thermo Electron Corporation, Serien-Nr.:

40623058) geöffnet und anschliessend mittels Pipette (Eppendorf Research Plus®, 100-1000µl, Serien-Nr.:P23497B) und steriler Pipettenspitze (Thermo Scientific®, non-filtered, Volumen: 1000 µl) 500 µl steriles PBS zugesetzt. Anschliessend wurde das Probenbehältnis wieder sicher verschlossen.

Das ursprüngliche Volumen der Probe (500 µl) wurde damit auf 1000 µl (1 ml) erhöht. Dies entspricht einer Konzentration von 2,499 mg/ml für die niedrig konzentrierte, verdünnte Injektionslösung bei CoCr sowie einer Konzentration von 7,497 mg/ml für die hoch konzentrierte, verdünnte Injektionslösung von CoCr.

Für die niedrig konzentrierte, verdünnte Injektionslösung von Si₃N₄ ergab sich damit eine Konzentration von 1,032 mg/ml und für die hoch konzentrierte, verdünnte Injektionslösung eine Konzentration von 3,096 mg/ml.

Nach Verdünnung der jeweiligen Probe wurde diese mittels des Vortex-Mischers für 20 Sekunden aufgerüttelt. Anschliessend wurde die verdünnte Lösung mittels eines Ultraschall-Bades (Bandelin Sonorex Digitec, Typ DT 100 H, Serien-Nr.: 3230.00064036.015, Frequenz 35 kHz, Leistung 80/320 W, Wassertemperatur zwischen 18°C und 35°C) für 10 min soniziert, dadurch nochmals homogenisiert und gleichzeitig einer Agglutination der einzelnen Partikel untereinander vorgebeugt.

Daraufhin wurde die Probe für 10 s mit dem Vortex-Mischer aufgerüttelt. Der Vorgang des Sonizierens (für 10 min) und anschliessenden Aufrüttelns mittels Vortex-Mischers (für 10 s) wurde insgesamt vier Mal wiederholt. Anschliessend wurde die Probe mittels einer Pipette (Eppendorf Research Plus®, 100-1000µl, Serien-Nr. P23497B) mit steriler Pipettenspitze (Thermo Scientific®, non-filtered, Volumen: 1000 µl) mehrmals resuspendiert und anschliessend in fünf gleich grosse Teilmengen zu je 200µl aufgeteilt. Jede Teilmenge wurde in sterile Eppendorf-Tubes® (LOT-Nr. D155996K) mit einem Fassungsvermögen von 500 µl transferiert.

Die Behältnisse der Teilmengen wurden anschliessend zur eindeutigen Identifizierung mittels kälte- und chemikalienresistentem, dauerhaftem Markierstift gekennzeichnet und etikettiert (Microtube Tough spots®, 3/8 Zoll Durchmesser, Farbe Blau für HC 1 und HC2, Farbe Rot für LC 1 und 2, Farbe Grün für LS1 und LS2, Farbe Orange für HS1 und HS2).

Alle angefertigten Teilmengen wurden daraufhin in den Tiefkühler (Raum TFA 00.05) verbracht und dort bei -18°C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert.

3.4 Massnahmen und Tierhaltung in der Akklimatisationsphase

Die Haltung sowie die Operationen der Ratten fanden im Biologischen Zentrallabor (BZL), Universitätsspital, Universität Zürich (UZH), Rämistrasse 100, MOU2 8091 Zürich, Raum B116 statt.

Alle eingesetzten Tiere durchliefen nach Ihrer Ankunft eine Akklimatisationsphase von 14 Tagen, um sich von Transport zu erholen sowie sich an ihre neuen Umgebungs- und Haltungsbedingungen anpassen zu können. Die Tiere wurden spätestens einen Tag nach Ankunft und Einnistung in der Tierhaltung sowie am Tag der Operation einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen.

Die Versuchstiere wurden während der Akklimatisationsphase an Wochentagen täglich mindestens zweimal und an Wochenend- und Feiertagen einmal täglich einer Gesundheitskontrolle durch die versuchsdurchführende Person unterzogen.

Um eine individuelle (berührungslose) Identifikation zu ermöglichen, wurden den Tieren am Tag der Einnistung mit wasserunlöslichen Filzstiften Ringe am Schwanzansatz (in unterschiedlichen Farben und unterschiedlicher Anzahl) aufgebracht. Diese Markierungen wurden im Zuge des wöchentlichen Käfigwechsels sowie am Tag der Operation erneuert. Zusätzlich wurden den Versuchstieren am Tag der Operation direkt nach der Narkoseeinnistung Transponder (implantable classic glass transponders DATAMARS®, PetLink™, Bedano-Lugano, Schweiz) subkutan im Flankenbereich implantiert. Diese dienten als redundante Markierung, falls die farbigen Schwanzmarkierungen nicht mehr lesbar sein sollten.

Um die Funktionsfähigkeit der implantierten Transponder zu überprüfen, wurden diese direkt nach der Implantation durch ein Transponderlesegerät (DATAMARS®, Modell „MINIMAX II“, Bedano-Lugano, Schweiz) ausgelesen und die ausgelesene Transpondernummer mit der dem Transponder beiliegenden Nummer verglichen.

Die Ratten wurden jeweils zu dritt in hermetisch verschlossenen, standardisierten Käfigen (Modell Sealsafe® Blue Line IVC Typ II, T1500U Cage, Tecniplast, Hohenpeissenberg, Deutschland) mit separater Luftzirkulation (Be- und Entlüftung) eingestallt. Die Zuordnung der Käfige erfolgte mittels spezieller Käfigkarten, welche mit dem Namen des Studienleiters, dem Schlüssel der Schwanzmarkierungen sowie (nach der Operation) zusätzlich den Transpondernummern der eingestellten Tiere beschriftet waren. Die Ein- und Umstellungen (Käfigwechsel) sowie die Entnahme der Tiere aus den Käfigen zu Untersuchungszwecken, das Anbringen von Schwanzmarkierungen und sonstige Massnahmen erfolgten ausschliesslich unter einer

Sicherheitswerkbank (Laminarflow Animal Transfer Station, Hersteller: Allentow, Modell: Phantom, Serien.-Nr.: 110339081A). Den Ratten wurde während der gesamten Versuchsdauer standardisiertes und konditioniertes Leitungswasser (Desinfektion durch ProMinent®, Regensdorf, Schweiz) sowie spezielles GLP-zertifiziertes Futter (M/R HALTUNG GLP, PELLETS GROSS, Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten, Art.-Nr.: 3433 PX S15, LOT-Nr.: 1411818) ad libitum angeboten. Alle 7 Tage wurden sowohl der Käfig als auch die Einstreu durch einen neuen Käfig und frische, sterilisierte Einstreu ersetzt. Sowohl Käfig als auch Einstreu (Sägespäne und Heu) wurden vom BZL bereitgestellt und vor dem Einsatz durch das Personal des BZL sterilisiert sowie regelmässig repräsentative Rückstandsproben der verwendeten Einstreu gezogen.

3.5 Operation/ chirurgischer Eingriff

3.5.1 Vorbereitende Massnahmen

Die für die Operation verwendeten Spritzen (Hamilton 25 µl Syringe, Model 702 RN SYR, HA-7636-01; Hamilton Bonaduz AG, Via Crusch 8, Bonaduz, CH 7402, Schweiz; Vertrieb durch BGB Analytik AG, Rohrmattstrasse 4, 4461 Boeckten, Schweiz) und Kanülen (Hamilton RN NEEDLE (22s/51/2)S pk. 6; Hamilton Bonaduz AG, Via Crusch 8, Bonaduz, CH 7402, Schweiz; Vertrieb durch BGB Analytik AG, Rohrmattstrasse 4, 4461 Boeckten, Schweiz) wurden vor dem chirurgischen Eingriff sterilisiert und anschliessend steril verpackt in das Biologische Zentrallabor verbracht.

Vor dem chirurgischen Eingriff wurde der OP-Tisch desinfiziert und mit sterilen Abdecktücher abgedeckt, sowie sterile OP-Handschuhe, Chip-Transponder zur Identifizierung der Tiere sowie die sterilen Spritzen und Kanülen bereitgelegt.

Des Weiteren wurde die Box zur Narkoseeinleitung, Material und eine Atemmaske für die Inhalationsnarkose, der Rasierapparat (Isis GT420; Mat.-Nr.: 90200714; Aesculap Suhl GmbH, Fröhliche-Mann-Strasse 15, 98528 Suhl, Deutschland) das Material für die Erneuerung der farbigen Schwanzmarkierungen sowie die Waage (Mettler PM 4600; Serien-Nr.: H44594; Mettler Toledo GmbH, Im Langacher 44, Schweiz) zur Wägung der Ratten vorbereitet und kalibriert. Ausserdem wurden für jeden chirurgischen Eingriff je vier Käfige für die Aufwachphase vorbereitet (Modell Sealsafe® Next 1291HN, IVC Typ III; Tecniplast Deutschland GmbH, 82383 Hohenpeissenberg), welche mit Wärmeplatten ausgestattet wurden, um einer Unterkühlung der Tiere in der

Aufwachphase vorzubeugen. Vor Einleitung der Inhalationsarkose wurden die Tiere einer Gesundheitskontrolle auf äusserliche Krankheitsanzeichen unterzogen.

Test- und Referenz-Substanz

Die Testsubstanz (Si_3N_4) wird, wie erwähnt, jeweils mit „T“, die Referenzsubstanz (CoCr) mit „R“ bezeichnet. Die für die jeweilige Operation benötigten Eppendorf Tubes® mit den verdünnten Injektionslösungen sowie das Soniziergerät und der Vortex-Mischer wurden direkt vor dem chirurgischen Eingriff in das Biologische Zentrallabor des Universitätsspital Zürich (OP-Vorbereitungsraum B111A) transportiert. Der Transport der Eppendorf Tubes® erfolgte in verschlossenen Falcon® Tubes mittels einer gekühlten Transportbox. Während des ca. 30-minütigen Transportes konnten die verdünnten Injektionslösungen auftauen.

Die jeweilige Injektionslösung wurde nach Ankunft im Operations-vorbereitungsraum B111A, für die Injektion aufbereitet. Hierfür wurde die Probe mittels des Vortex-Mixers für 10 s aufgeschüttelt und anschliessend für 10 min soniziert. Diese beiden Schritte wurden beide insgesamt vier Mal direkt hintereinander durchgeführt.

Bei der Sonizierung der Injektionssubstanzen wurde die Wassertemperatur fortlaufend gemessen, um gegebenenfalls kaltes Wasser dazu zu giessen, sollte sich die Temperatur auf über 35°C erhöhen.

Laut Arbeitsanweisung des Projektpartners mussten die Injektionen spätestens 30 min nach der Aufbereitung erfolgen. Anderenfalls hätte die Aufbereitungs-Prozedur wiederholt werden müssen. An keinem der Operationstage wurde der vorgegebene Zeitrahmen überschritten. Direkt vor dem Aufziehen der Substanz wurde diese nochmals für wenige Sekunden mittels Vortex-Mixer aufgerüttelt, um sicherzustellen, dass keine Sedimentation der Partikel am Boden des Eppendorf Tubes® stattgefunden hatte.

3.5.2 Anästhesie

Für die Narkoseeinleitung wurden die Tiere einzeln in eine Narkosebox verbracht. Diese war luftdicht verschliessbar und mittels eines kombinierten Zu- und Abfuhrschlauches für das Gasgemisch mit einem Inhalationsnarkosegerät (Fortec Isofluran Verdampfer, Serien-Nr.: 3333 sowie Provet Isofluran Verdampfer, Serien-Nr.: 703) verbunden. Über diesen Schlauch wurde ein Isofluran- Sauerstoffgemisch,

bestehend aus Isofluran (5%, Attane™, MINRAD INC., Buffalo, NY, USA) in Sauerstoff (flow 800ml/min) in die verschlossene Box eingeleitet.

Nach Erreichen der gewünschten Sedationstiefe, erkennbar am völligen Bewusstseinsverlust sowie dem Verlust von Tiefensensibilität, Lid- sowie Cornealreflex, wurde das Tier aus der Box entnommen und über eine Atemmaske weiter in Narkose gehalten. Diese wurde dem Tier über das Maul gestülpt und direkt an den kombinierten Zu- und Abfuhrschlauch des Narkosegerätes angeschlossen. Die Narkosetiefe wurde durch die Regulation des Isofluran-/Sauerstoffverhältnisses erreicht, welche individuell angepasst werden konnte (Isofluran-Konzentration im Gasgemisch: 2.0-4.5 Vol%). Die erforderliche Analgesie wurde über eine subkutane Ketamin-Injektion (20 mg/kg KGW, Ketazol-100®, Gräub AG, Bern, Schweiz) erreicht, welche etwa fünf Minuten vor dem chirurgischen Eingriff verabreicht wurde. Zusätzlich wurde durch das Auftragen einer Vitamin-A Augensalbe (Bausch & Lomb Swiss AG, 6301 Zug, Lot-Nr.: 553) wurde die Kornea des in Narkose liegenden Tieres vor dem Austrocknen geschützt.

3.5.3 Präoperative Massnahmen

Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung wurden die Tiere im Bereich der linken Flanke sowie im Injektionsbereich (rechte Hintergliedmasse von Hüft- bis Sprunggelenk) rasiert, die losen Haare mittels eines Klebestreifens entfernt und die Haut anschliessend mit einem alkoholischen Hautantiseptikum (Kodan®, Schülke & Meyer GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Anschliessend wurde jedem Tier im Bereich der linken Flanke subkutan der Transponder-Chip für die individuelle Identifizierung implantiert. Die durch den Einstich entstandene Läsion wurde mittels einer Wundnaht (6/0 VICRYL, ETHICON/ Johnson & Johnson Medical GmbH, Hummelsbütteler Steindamm 71, 22851 Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

3.5.4 Chirurgischer Eingriff

Nach Abschluss der präoperativen Massnahmen wurden die Tiere auf den vorbereiteten OP-Tisch umgelagert, wieder mittels Atemmaske an den Isofluran-Verdampfer angeschlossen sowie die Narkosetiefe überprüft und bei Bedarf angepasst.

Für die korrekte Lagerung und Fixation wurde die Ratte in Rückenlage mittels Klebeband auf der Unterlage fixiert, wobei das Klebeband auf Höhe des Halsansatzes locker über den Hals verlief, die Vorderläufe des Tieres mit umfasste und in nach rostral gestreckter Stellung fixierte (siehe Abb. 3.5.4/1).



Abb. 3.5.4/1: Lagerung der Ratte auf dem OP-Tisch

Anschliessend wurde die Haut des Operationsbereichs nochmals mittels eines antiseptischen Alkoholsprays (Kodan®, Schülke & Meyer GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert.

Zur Injektion der entsprechenden Substanz (entsprechend der Gruppe entweder Test- oder Referenzsubstanz in hoher oder niedriger Konzentration) in das Kniegelenk musste der Operateur zunächst mittels der Spritzen-/Kanülen-Kombination 20 µl der Injektionssubstanz aus dem angereicherten Eppendorf Tube® aufziehen.

Im nächsten Schritt wurde das rechte Kniegelenk durch die linke Hand des Operateurs in Stellung gebracht. Anschliessend wurde mit der rechten Hand die Nadel cranial vom Seitenband des rechten Femorotibialgelenkes in das Femorotibialgelenk eingeführt und die Injektionssubstanz in die Gelenkhöhle injiziert (siehe Abb. 3.5.4/2). Die Gelenkinjektionen wurden jeweils von derselben, erfahrenen Person durchgeführt.



Abb. 3.5.4/2: Positionierung der Injektionsnadel

Nach Injektion wurde die Nadel zurückgezogen und sofort Druck auf die Einstichstelle ausgeübt, wobei hier der Daumen auf der Einstichstelle und der Zeigefinger der selben Hand kontralateral auf der gegenüberliegenden Seite des Gelenkes platziert wurde, um ein Austreten der injizierten Flüssigkeit in umliegendes Gewebe zu verhindern. Eine chirurgische Versorgung der Einstichstelle war nicht notwendig, da die verwendete Kanüle lediglich einen Durchmesser von 22 Gauge aufwies, die Läsion dementsprechend klein war und ein Nachbluten nicht erwartet war.

3.5.5 Postoperatives Management

Nach erfolgreicher Injektion der Substanz wurde das jeweilige Tier von der Inhalationsnarkose genommen und in einen der Aufwackkäfige verbracht. In der vorgeschriebenen postoperativen Überwachungsphase von einer Stunde wurden die Tiere konstant überwacht. Sobald sie wieder steh- und gehfähig waren, sowie keine pathologische Erscheinungen (z.B. Schonhaltung, Desorientierung, Schwellung des operierten Gelenkes etc.) zeigten, wurden sie wieder in frisch eingestreute Gruppenkäfige eingestallt.

Innerhalb des postoperativen Überlebenszeitraumes wurden die Tiere zweimal täglich einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Es wurde hierbei besonders auf pathologische Anzeichen des Bewegungsapparates geachtet, insbesondere auf Anzeichen von Beeinträchtigungen des manipulierten rechten Kniegelenkes wie Schwellung, Hypervaskularisation, Schonhaltungen oder sonstige Schmerz- oder Entzündungsanzeichen.

3.6 Euthanasie

Nach der jeweiligen postoperativen Überlebenszeit von zwei bzw. sieben Tagen wurden die entsprechenden Tiere durch die farbigen Schwanzmarkierungen sowie die Transponder eindeutig identifiziert. Daraufhin wurden diese Tiere in einer hermetisch verschliessbaren, durchsichtigen CO₂- Box euthanasiert. Die Grösse und das Volumen der Box entsprachen in etwa der Grösse eines Käfigs der Kategorie IVC Typ 3.

Hierfür wurden jeweils drei Tiere aus dem selben Käfig zusammen in die Box verbracht. Daraufhin wurde diese verschlossen und Kohlenstoffdioxid in einer Konzentration von 100 Vol.% und einer Einströmgeschwindigkeit von 3 l/min für die Dauer von mindestens zehn Minuten eingeleitet. Die Einleitung des CO₂ wurde erst beendet, wenn keines der Tiere mehr Atembewegungen zeigte und reglos in der Box lag. Daraufhin wurde die CO₂-Zufuhr unterbrochen, die Box geöffnet und die Tiere entnommen und untersucht. Hierbei wurde kontrolliert, dass auskultatorisch in einem Zeitraum von mindestens zwei Minuten kein Herzschlag mehr hörbar sowie Lid- und Cornealreflex negativ waren. Anschliessend wurden die Tierkörper in eine gekühlte Transportbox verbracht und zur Gewebeentnahme in das Tierspital der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich transportiert.

3.7 Probengewinnung und Probenaufbereitung

3.7.1 Probengewinnung

Nach Ankunft der Tiere im Histologielabor (Raum TFA 00.02) der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, wurde mittels Transponderchip und Schwanzmarkierungen nochmals eine eindeutige Identifikation der Tiere durchgeführt, bevor deren Kadaver sezziert wurden.

Es wurden jedem Tier zum einen Proben von Weichteilgewebe entnommen sowie zum anderen die beiden Hintergliedmassen zur weiteren Bearbeitung abgetrennt.

Gewinnung von Organproben/Weichteilgewebe

Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde ein Leberlappen sowie beide Nieren und die Milz im Ganzen entnommen und sofort in 4%igem, gepuffertem Formaldehyd fixiert.

Anschliessend wurden die Inguinal- und Popliteallymphknoten beider Hintergliedmassen entnommen und unverzüglich in 4%iges, gepuffertes Formaldehyd verbracht.

Entnahme der Hintergliedmassen

Zur Gewinnung der Hintergliedmassen wurden bei diesen in einem ersten Schritt zunächst die distalen Enden der Extremitäten in Höhe der Sprunggelenke abgetrennt. Anschliessend wurde der verbliebene Teil der Hintergliedmasse im Ganzen in den Hüftgelenken vom Tierkörper abgetrennt.

Im Folgenden wurde das Fell der entnommenen Anteile der Hintergliedmassen entfernt und der proximale Anteil einer jeden Gliedmasse in Höhe der Mitte des Oberschenkels durchtrennt, sowie grössere Muskel- und Sehnenanteile der verbliebenen Anteile der jeweiligen Gliedmasse entfernt, um die nachfolgende Fixation des Kniegelenkes zu erleichtern und zu verbessern.

Nun wurde die Gelenkkapsel des Kniescheibengelenks (Femoropatellargelenks), das mit dem Femorotibialgelenk kommuniziert, vorsichtig von lateral parallel zum lateralen Rand der Patellarsehne eröffnet. Daraufhin wurde mit einer sterilen Kanülen-/Spritzen-Kombination Synovialflüssigkeit entnommen und diese als Schmierpräparat auf einen Objektträger appliziert.

Anschliessend wurde der schon bestehende Einschnitt so weit nach proximal und distal erweitert, dass die Patella nach medial luxiert werden konnte und in gebeugter Stellung ein freier Blick auf die artikulierenden Flächen von Femur, Tibia und Patella ermöglicht wurde (siehe Abb. 3.7.1/1).

Die sichtbaren Strukturen des eröffneten Gelenkes wurden fotografiert und anschliessend makroskopisch eventuell sichtbare histopathologische Veränderungen evaluiert.



Abb. 3.7.1/1: Präparat eines Kniegelenkes mit Histologie-Kassette vor der Fixation

Beide Kniegelenke (links und rechts) wurden anschliessend mit 4%igem Formaldehyd fixiert.

3.7.2 Probenaufbereitung

Sowohl die Weichteilgewebeproben (Leberlappen, Nieren, Milz, Lymphknoten) als auch die Hartgewebeproben (Hintergliedmassen) wurden nach 48 Stunden aus der Fixierlösung entnommen.

Die Gewebeproben der Gelenkkapseln verblieben aufgrund ihrer geringen Grösse und mit Hinsicht auf eine eventuell nachfolgende, immunhistochemische Untersuchung lediglich 24 Stunden in der Fixierlösung.

Entkalkung der Hartgewebeproben:

Sämtliche Proben, die Knochen enthielten, mussten zuerst entmineralisiert werden, um die Herstellung von Paraffinschnitten zu ermöglichen. Die Entkalkung erfolgte mit EDTA, das eine Komplexbildung mit den Kalzium-Ionen des Gewebes eingeht. Diese werden dadurch aus dem Gewebe herausgelöst.

Für den Entkalkungsvorgang wurden die Kniegelenkproben nach Entnahme aus der Fixierlösung einzeln in Einbettkassetten (SWINGSETTE TISSUE PROCESSING/EMBEDDING CASSETTES WITH LID; Simport, 2588 Bernard-Pilon, Beloil QC J3G 4S5, Canada; Ref.Nr.: M515-3, Lot-Nr.: A32528317) verbracht und für insgesamt 21 Tage in lichtundurchlässigen und luftdichten Glasgefässen in 25 % EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) gelagert. Die Gefässe waren auf einem Schüttler (HS501 D, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Janke & Kunkel-Str.10, D-79219 Staufen, Serien-Nr.:980300.20) positioniert (72 Umdrehungen/min), um eine gleichmässige Verteilung der Entkalkungslösung zu gewährleisten. Nach Ablauf von acht Tagen wurde das EDTA gewechselt. Etwa alle fünf Tage wurden stichprobenartig Proben aus der Lösung entnommen und mittels einer dünnen Kanüle der Knochen dieser Proben an einer für die weitere Untersuchung unbedeutenden Stelle angestochen und so auf seine Härte bzw. Schnittfähigkeit geprüft. Nach Ablauf von 21 Tagen waren alle Proben weich genug, um Dünnschnitte anfertigen zu können.

Nach abgeschlossenem Entkalkungsvorgang wurden die Proben für 20 min behutsam unter fliessendem Leitungswasser ausgewaschen, um Reste der Entkalkungslösung aus dem Gewebe zu lösen.

Entwässerung der Proben

Die Entwässerung dient dazu, sämtliche in vorangegangenen Schritten verwendeten Chemikalien (Fixierlösung, Entkalkungslösung etc.) aus dem betreffenden Gewebe zu entfernen und dieses auf die nachfolgende Einbettung in Paraffin vorzubereiten.

Nach abgeschlossener Fixation der Weichteilgewebe wurden der Leberlappen sowie die Nieren und die Milz vor der Entwässerung in ca. 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden so geschnitten, dass sie einen Querschnitt des Organs ergaben, in welchem sämtliche, für die spätere histologische Evaluierung interessanten Strukturen beinhaltet waren. Die Kniegelenke wurden nach der Entkalkung entlang der Gliedmassenachse halbiert.

Leber-, Milz- und Nierenteile sowie die entkalkten Kniegelenke und die nicht zugeschnittenen Popliteal- und Inguinallymphknoten wurden anschliessend in Einbettkassetten (Swingsette tissue processing/embedding cassettes with lid; Simport, 2588 Bernard-Pilon, Beloil QC J3G 4S5, Canada; Ref.Nr.: M515-3, Lot-Nr.: A32528317) verbracht und mittels eines Entwässerungsautomaten (Leica Histoprocessor ASP200 S, Leica Microsystems, D-69226 Nussloch, Serien-Nr.: 3783)

vollautomatisch entwässert, wobei hier für die Weichteilgewebe das Programm „Routine overnight“ und für die Gliedmasse das Programm „Bone“ verwendet wurde. Hierbei durchliefen die Proben eine aufsteigende Alkoholreihe, wurden anschliessend mit Xylol als Intermedium behandelt und dann bis zur Einbettung in flüssigem Paraffin gelagert.

Einbettung der Proben

Nach Entnahme aus dem Entwässerungsautomaten wurden die mit Paraffin getränkten Proben mitsamt der Einbettkassetten in die Einbettwanne der zuvor auf Betriebstemperatur erwärmten Ausgiess-Station (Leica Ausgiess-Station; Leica Microsystems Nussloch, D-69226 Nussloch; Model: EG 1150H, Serien.-Nr.: 8067) überführt. Anschliessend wurden die Proben aus ihrer jeweiligen Einbettkassette entnommen und in eine erwärmte Einbettschale verbracht.

Hierbei wurde die Probe derart auf dem Boden der Einbettschale positioniert, dass sie beim nachfolgenden Herstellen der Dünnschnitte so geschnitten werden konnte, dass sich möglichst aussagekräftige Dünnschnitte für die anschliessende histologische Evaluierung herstellen liessen. Nach exakter Positionierung wurde die Probe, mittels Abkühlung der Einbettschale, durch aushärtendes Paraffin zwischen Probe und Schalenboden am Boden der Einbettschale fixiert. Anschliessend wurde die Einbettschale mit dem Boden der Einbettkassette bedeckt und anschliessend bis zum Rand mit flüssigem Paraffin gefüllt.

Daraufhin wurde die gefüllte Schale zum Abkühlen und Aushärten des Paraffins auf eine Kühlplatte (Leica Kühlplatte, Leica Microsystems Nussloch, D-69226 Nussloch,; Model: EG 1150C; Serien.-Nr.: 8067) verbracht. Nach kompletter Aushärtung des Paraffins wurde der entstandene Paraffin-Block, mitsamt des individuell beschrifteten Einbettkassettenbodens aus der Schale herausgelöst. Abschliessend wurden die Paraffinblöcke entgratet und so von überstehenden Paraffinresten befreit.

Herstellen von Dünnschnitten

Die Herstellung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Dünnschnitte aus den Weichteilgeweben wurde im Zentrum für klinische Studien der Vetsuisse-Fakultät Zürich durchgeführt. Die Herstellung von Dünnschnitten aus den zuvor angefertigten Paraffinblöcken erfolgte mittels eines Rotationsmikrotoms (Leica Rotationsmikrotom; Leica Microsystems Nussloch, D-69226 Nussloch; Modell: RM CoolClamp 14 0502

46573; Serien-Nr.: 0291). Hierfür mussten die Paraffinblöcke zuerst in einem Tiefkühler (Raum TFA 00.05) auf ca. -20°C heruntergekühlt werden, um die Härte und Schnittfestigkeit des Paraffins zu erhöhen.

Anschliessend wurden die Blöcke aus dem Tiefkühler entnommen und sofort in den Universal-Kassettenhalter des Rotationsmikrotoms eingespannt, welcher mittels einer aktiven Kühlvorrichtung (Leica RM CoolClamp; Leica Microsystems Nussloch, D-69226 Nussloch; Model: RM CoolClamp 14 0502 46573; Serien-Nr.: 0291) schon im Vorfeld konstant gekühlt wurde.

Nun wurde der Block mittels Grobtrieb an das stehende Messer herangeführt und durch Orientierschrauben mit der gewünschten Schnittebene parallel zum Messer ausgerichtet. Im Anschluss wurde der Block unter Einsatz des Grobtriebes angetrimmt bis die gewünschte Schnittebene erreicht war.

Daraufhin wurden mehrere aufeinanderfolgende Schnitte mit 2 µm Schnittdicke hergestellt. Diese wurden mithilfe eines Pinsels vom Messer abgenommen und behutsam in ein Wasserbad mit Raumtemperatur überführt. Anschliessend wurden sie mittels einer dünnen Nadel voneinander getrennt und bei Bedarf vorhandene Falten mit Hilfe zweier Pinsel ausgestrichen. Daraufhin wurden die Schnitte auf beschriftete Objektträger (Adhäsions-Objektträger, SuperFrost® Plus, Menzel Gläser) aufgezogen und in ein Wasserbad mit erwärmtem Wasser überführt. Die Temperatur des Wassers betrug 42°C – 45°C und diente dazu, die Schnitte mittels Wärmeausdehnung zu strecken und dadurch zu glätten. Die Schnitte wurden mehrere Minuten im Wasserbad belassen. Im letzten Schritt wurden die nun vollständig gedehnten Schnitte wieder auf dieselben Objektträger gezogen, auf welchen sie nun aufgrund Ihrer Erwärmung dauerhaft fixiert waren.

Die fertigen Schnitte wurden in einem Objektträgergestell platziert und für mindestens 24 Stunden im Inkubator (Inkubator In55 plus; Memmert GmbH & Co. KG; Modell In55 plus; Serien-Nr.: D212.02246) bei 37°C in Raum TFA 00.03 getrocknet.

Die Paraffinblöcke der Hintergliedmasse wurden am Institut für Veterinärpathologie des Tierspitals der Universität Zürich auf die gleiche Weise geschnitten.

Die eingebetteten Gelenkkapseln wurden zurückgestellt und vorerst nicht weiter bearbeitet, da auch in den Schnitten der Kniegelenke Abschnitte der Synovialmembranen sichtbar und somit beurteilbar und histologisch auswertbar waren.

Entparaffinieren der Dünnschnitte

Die getrockneten Dünnschnitte mussten entparaffiniert werden, um das hydrophobe, wasserunlösliche Paraffin aus dem Gewebe der Dünnschnittprobe zu entfernen und die Schnitte in ein wässriges, hydrophiles Medium zu bringen um eine anschliessende Färbung möglich zu machen. Hierfür wurden die Objektträger mit den aufgezogenen Dünnschnitten in einem Objektträger-Tauchgestell in einer vorgegebenen Reihenfolge und unter Einhaltung exakter Zeitvorgaben, zuerst durch Xylol und anschliessend durch eine absteigende Alkoholreihe geführt. Im Anschluss wurden die Objektträger mit entionisiertem Wasser gespült.

Färbung der Dünnschnitte aus den Weichteilgewebeproben

Die Dünnschnitte sämtlicher eingebetteter Weichteilgewebeproben wurden einer Hämatoxylin (Haematoxylin Lösung Gill No. 2, SIGMA ALDRICH; Ref.-Nr.: GHS232-1L; Lot-Nr.:SLBJ9872V) - Eosin (Eosin Y, alkoholisch; Ref.-Nr.:HT110132-1L; Lot-Nr.: SLBM5597V) Färbung unterzogen.

Die Färbung der Schnitte verlief nach einer vorgegebenen Arbeitsanweisung, in welcher die Reihenfolge und Verweildauer der Objektträgergestelle in den entsprechenden Küvetten exakt vorgegeben waren. Um sie dauerhaft zu schützen, wurden die gefärbten Dünnschnitte anschliessend noch mit Deckgläsern, welche mittels Flüssigklebstoff auf den Objektträgern fixiert wurden, eingedeckt.

Für die Auswertung der Kniegelenke wurden zusätzlich Schnitte für eine Toluidin-Blau Färbereihe sowie mehrere Reihen von Schnitten für die immunhistologischen Färbungen angefertigt.

Herstellung und Färbung von Schnitten aus den Hartgewebeproben

Die Herstellung und Färbung sowohl der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen, der Toluidin-Blau-Färbungen als auch der immunhistochemischen iNOS- und COX-2-Antikörperfärbungen der Dünnschnitte aus den Hartgeweben (Kniegelenken) wurde durch das Personal des histologischen Labors der Pathologie der Vetsuisse-Fakultät nach den Hersteller-Protokollen der angewendeten Färbemethoden durchgeführt (Protokolle siehe Anhang, Abb. 10.2/1-7).

Als immunhistochemische Färbungen waren ausserdem vorgesehen:

IL-1 (Interleukin-1), IL-6 (Interleukin-6), IL-8 (Interleukin-8), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) sowie PGE₂ (Prostaglandin E₂).

Da die Auswertung von Schnitten mit diesen immunhistochemischen Nachweisen jedoch zeigte, dass diese Schnitte wegen einer sehr hohen unspezifischen Hintergrundreaktion nicht geeignet waren, zusätzliche Erkenntnisse über die Gewebereaktion zu gewinnen, wurden diese Färbemethoden nicht für die Auswertung herangezogen.

3.8 Digitalisieren und Archivieren der Dünnschnitte

Die gefärbten Schnitte wurden mittels eines automatisierten Forschungsmikroskops (Leica DM 6000 B; Serien-Nr.:289900; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Deutschland) gesichtet und anschliessend mit einer speziellen Software (ImageAccess) digitalisiert und systematisch benannt.

3.9 Histologische Evaluation

3.9.1 Histologische Evaluation der Weichteilgewebe

Histologisch evaluiert wurden pro Tier jeweils die Hämatoxylin-Eosin-Dünnschnitte der Leberlappen, beider Nieren, der Milz sowie der Inguinal- und Popliteallymphknoten beider Hintergliedmassen.

Die Dünnschnitte wurden unter einem Forschungsmikroskop (Leica DMR; Typ 020-525.028; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Deutschland) von zwei unabhängigen Betrachtern ausgewertet. Die Evaluation fand verblindet statt, sodass es den Betrachtern nicht möglich war, die Schnitte während der Evaluation den jeweiligen Versuchsgruppen zuzuordnen. Die Dünnschnitte wurden unter 100-facher, 200-facher sowie 400-facher Vergrößerung beurteilt.

Die beiden Betrachter diskutierten ihre persönlichen Bewertungen eines jeden Schnittes. Es konnte für die Bewertung jeden Schnittes ein einheitlicher Konsens gefunden werden. Evaluiert wurde nach einem durch die Forschungsgruppe selbst entwickelten Bewertungssystem (siehe Abb. 3.9.1/1). Beispielbilder hierfür zeigen die Abbildungen 3.9.1/2 – 4.

Bewertungstabelle Leber		Bewertungstabelle Milz	
Histopathologie	Bewertung	Histopathologie	Bewertung
Strukturveränderungen		Strukturveränderungen	
keine	0	keine	0
milde, örtliche, fettige Infiltration um Zentralvenen	1	aktivierte Follikel, erhöhte Hämosiderosis	1
milde bis moderate fettige Infiltration um Zentralvenen und im Portalbereich, Sinusoid Dilatation	2	Vermehrte rote und weiße Pulpa	2
deutliche fettige Infiltration um Zentralvenen und im Portalbereich, Nekrose (hepatozelluläre Dissoziation)	3	Neutrophile Granulozyten in roter Pulpa, Nekrose, Fibrose	3
Entzündungszellen		Entzündungszellen	
keine	0	keine	0
fokale/einzeln auftretende Entzündungszellen	1	fokale/einzeln auftretende Entzündungszellen	1
mehrere/ multifokal auftretende Entzündungszellen	2	mehrere/ multifokal auftretende Entzündungszellen	2
hohe Anzahl/multifokal konfluierende Entzündungszellen	3	hohe Anzahl/multifokal konfluierende Entzündungszellen	3
Lokalisation von Partikelablagerungen		Lokalisation von Partikelablagerungen	
keine	0	keine	0
Makrophagen gebunden	1	Makrophagen gebunden	1
frei	2	frei	2
frei und Makrophagen gebunden	3	frei und Makrophagen gebunden	3
Anzahl extrazellulärer Partikel		Anzahl extrazellulärer Partikel	
keine	0	keine	0
vereinzelt	1	vereinzelt	1
unregelmäßig verstreut	2	unregelmäßig verstreut	2
lokale Anhäufungen	3	lokale Anhäufungen	3
Anzahl von Zellen mit intrazellulären Partikeln		Anzahl von Zellen mit intrazellulären Partikeln	
keine	0	keine	0
1 to 5	1	1 to 5	1
6 to 10	2	6 to 10	2
mehr als 10	3	mehr als 10	3

Bewertungstabelle Lymphknoten		Bewertungstabelle Niere	
Histopathologie	Bewertung	Histopathologie	Bewertung
Strukturveränderungen		Strukturveränderungen	
keine	0	keine	0
Aktivierung von Sekundärfollikeln, vaskuläre Läsionen des Kortex (Dilatation von Blut- und/oder Lymphgefäßen)	1	vereinzelte, proteinhaltige Flüssigkeit in proximalen Tubuli	1
lokal: sekundäre Follikelaktivierung, follikuläre Depletion (Atrophie), lymphatische Sinusektasie, vaskuläre und medulläre Läsionen von Medulla und Kortex (Dilatation von Blut- und/oder Lymphgefäßen), Makrophagen Hyperplasie	2	generalisiert auftretende, proteinhaltige Flüssigkeit in proximalen Tubuli, interstitielle Nephritis, geschwollene, mesangiale Zellen	2
gesamtes Organ (Cortex, Paracortex, Medulla): sekundäre Follikelaktivierung, follikuläre Depletion (Atrophie), lymphatische Sinusektasie, vaskuläre und medulläre Läsionen von Medulla und Kortex (Dilatation von Blut- und/oder Lymphgefäßen), Makrophagen Hyperplasie	3	Nekrose, Tubulonephrose, atrophische Glomeruli, tubuläre Zysten, papilläre Nekrose, Fibrose	3
Entzündungszellen		Entzündungszellen	
keine	0	keine	0
fokale/einzeln auftretende Entzündungszellen	1	fokale/einzeln auftretende Entzündungszellen	1
mehrere/ multifokal auftretende Entzündungszellen	2	mehrere/ multifokal auftretende Entzündungszellen	2
hohe Anzahl/multifokal konfluierende Entzündungszellen	3	hohe Anzahl/multifokal konfluierende Entzündungszellen	3
Lokalisation von Partikelablagerungen		Lokalisation von Partikelablagerungen	
keine	0	keine	0
Makrophagen gebunden	1	Makrophagen gebunden	1
frei	2	frei	2
frei und Makrophagen gebunden	3	frei und Makrophagen gebunden	3
Anzahl extrazellulärer Partikel		Anzahl extrazellulärer Partikel	
keine	0	keine	0
vereinzelt	1	vereinzelt	1
unregelmäßig verstreut	2	unregelmäßig verstreut	2
lokale Anhäufungen	3	lokale Anhäufungen	3
Anzahl von Zellen mit intrazellulären Partikeln		Anzahl von Zellen mit intrazellulären Partikeln	
keine	0	keine	0
1 to 5	1	1 to 5	1
6 to 10	2	6 to 10	2
mehr als 10	3	mehr als 10	3

Abb. 3.9.1/1: Bewertungstabelle der Weichteilgewebe

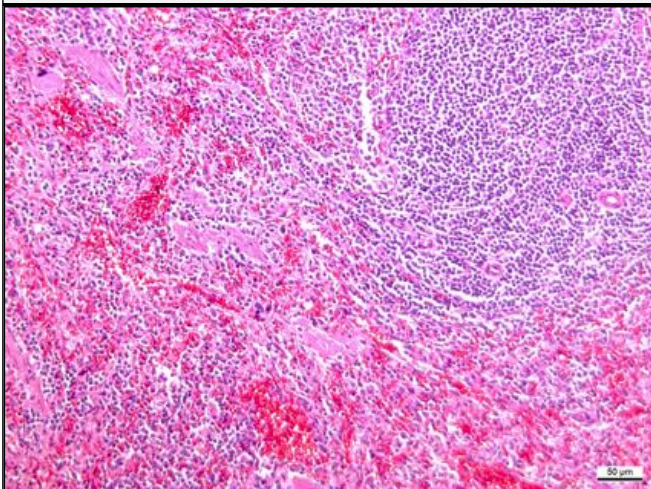
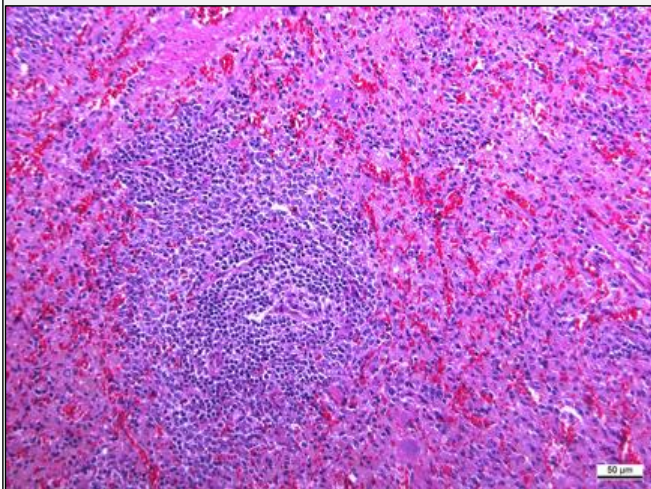
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung der Weichteilgewebe* (Tabelle 1)	
Milz:	
	<p>Beispielbild physiologische Gewebestruktur Milz: entspricht Bewertungsgrad 0 (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)</p>
	<p>Beispielbild Struktur Milzparenchym: aktivierte Follikel, teilweise erhöhte Hämosiderosis, entspricht Bewertungsgrad 1 (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)</p>
<p><small>*Anmerkung: Diese Tabelle beinhaltet lediglich Bilder, welche deutliche histopathologische Auffälligkeiten zeigen.</small></p>	

Abb. 3.9.1/2: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung der Weichteilgewebe (Milz, Tabelle 1)

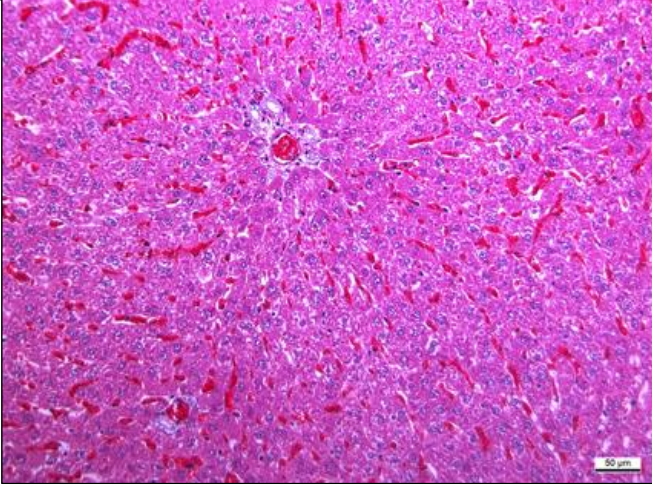
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung der Weichteilgewebe* (Tabelle 2)	
Leber:	
	<p>Beispielbild physiologische Gewebestruktur Leber: entspricht Bewertungsgrad 0 (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)</p>
	<p>Beispielbild Leberparenchym: multifokal auftretende Entzündungszellen (Lymphozyten), entspricht Bewertungsgrad 2 (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)</p>
<p><small>*Anmerkung: Diese Tabelle beinhaltet lediglich Bilder, welche deutliche histopathologische Auffälligkeiten zeigen.</small></p>	

Abb. 3.9.1/3: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung der Weichteilgewebe (Leber, Tabelle 2)

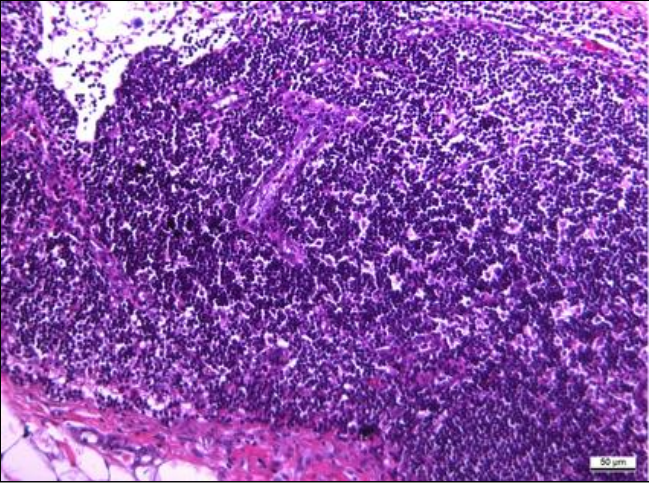
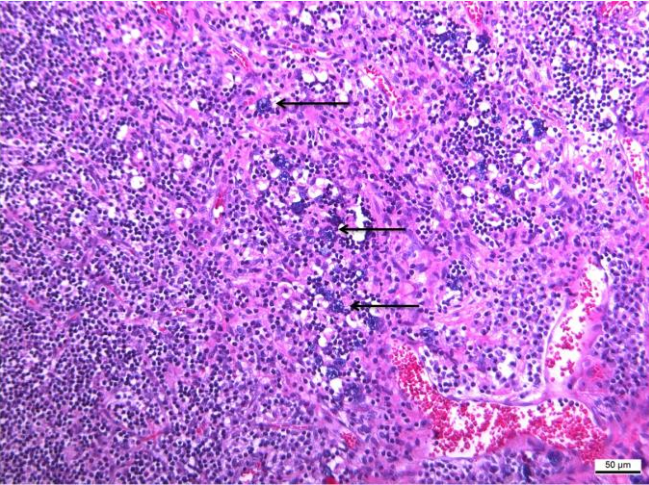
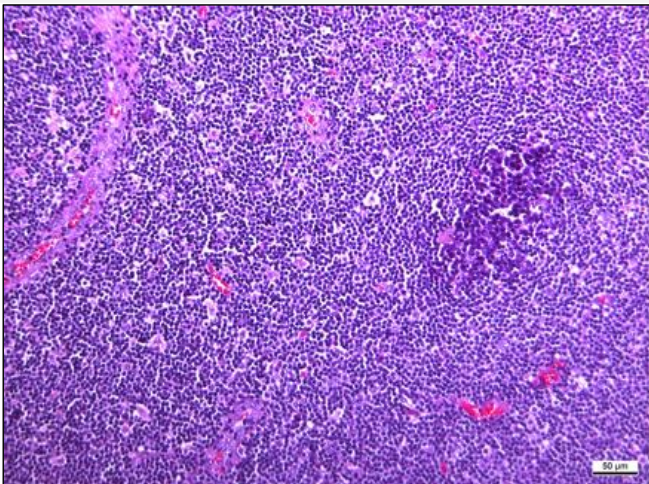
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung der Weichteilgewebe* (Tabelle 3)	
Lymphknoten:	
	<p><u>Beispielbild physiologische Gewebestruktur Lymphknoten:</u> entspricht Bewertungsgrad 0 (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)</p>
	<p><u>Beispielbild Struktur Lymphknoten:</u> sekundäre Follikelaktivierung, Makrophagenaktivierung (schwarze Pfeile), entspricht Bewertungsgrad 2 (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)</p>
	<p><u>Beispielbild Zellen Lymphknoten:</u> lokales Auftreten von Entzündungszellen, entspricht Bewertungsgrad 1 (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)</p>
<p>*Anmerkung: Diese Tabelle beinhaltet lediglich Bilder, welche deutliche histopathologische Auffälligkeiten zeigen.</p>	

Abb. 3.9.1/4: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung der Weichteilgewebe (Lymphknoten, Tabelle 3)

3.9.2 Histologische Evaluation der Hartgewebe (Kniegelenke)

Histologisch evaluiert wurden jeweils der Kniegelenkknorpel in zwei Bereichen des Femurs („Femur 1“, „Femur 2“) sowie in einem Bereich der Tibia („Tibia“).

Der Knorpel wurde hinsichtlich seiner Struktur, der Anordnung der Knorpelzellen und der Intaktheit der Tidemark beurteilt. Ausserdem wurden an diesen Schnitten sowohl die Synovialmembran als auch der Fettkörper auf das Auftreten von entzündlichen bzw. degenerativen Gewebeveränderungen hin betrachtet. Weiterhin wurden Menge, Lokalisation und Auftreten (frei im Gewebe bzw. intrazellulär) von Partikeln der jeweils applizierten Substanz im Bereich von Gelenkspalt, Synovialmembran und Fettkörper des Kniegelenkes beurteilt.

An den immunhistochemisch gefärbten Dünnschnitten wurde die Exprimierung einer COX-2- bzw. iNOS-Antikörperreaktion im Bereich der Synovialmembran und des Fettkörpers des betreffenden Gelenkes beurteilt.

Die Dünnschnitte wurden auch hier unter einem Forschungsmikroskop (Leica DMR; Typ 020-525.028; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Deutschland) von zwei unabhängigen Betrachtern ausgewertet.. Evaluiert wurde auch hier nach einem durch die Forschungsgruppe selbst entwickelten Bewertungssystem (siehe Abb. 3.9.2/1). Beispielbilder für die Auswertungen zeigen die Abbildungen 3.9.2/2-7.

Bewertungstabelle Kniegelenke			Bewertung
Knorpel (modifizierter Mankin Score)			
Struktur:	Normal	0	
	Oberflächen-Irregularitäten	1	
	Pannus und Oberflächen-Irregularitäten	2	
	Risse bis in die Übergangszone	3	
	Risse bis in die radiäre Zone	4	
	Risse bis in die kalzifizierte Zone	5	
	Vollständige Desorganisation	6	
Zellen:	Normal	0	
	Diffuse Hyperzellularität	1	
	Zellklone	2	
Tidemark Integrität:	Intakt	0	
	durchzogen von Blutgefäßen	1	
	Hyperzellularität	2	
	Hypozellularität	3	
Partikel			
Lokalisation von Partikel-Ablagerungen:	keine Partikel	0	
	Makrophagen gebunden	1	
	frei	2	
	frei und Makrophagen gebunden	3	
Menge an freien Partikeln:	keine	0	
	vereinzelt	1	
	unregelmäßig verstreut	2	
	lokale Anhäufungen	3	
Menge an Zellen mit phagozytierten Partikeln:	keine	0	
	1 bis 5	1	
	6 bis 10	2	
	mehr als 10	3	
Synovialmembran			
	physiologische Struktur	0	
	leichte Strukturveränderung	1	zwei Zellschichten, Verdickung
	moderate Strukturveränderung	2	mehr als zwei Zellschichten
	deutliche Strukturveränderung	3	deutliche Infiltration durch Entzündungszellen
Fettkörper			
	physiologischer Aufbau	0	
	leichte Veränderung	1	Auftreten von einzelnen Entzündungszellen
	mäßige Veränderung	2	Auftreten unregelmäßig verstreuter Entzündungszellen
	deutliche Veränderung	3	deutliche Infiltration durch Entzündungszellen, Fibrose
IHC Expression von COX-2 im Bereich der Synovialmembran			
	keine	0	0-25% angefärbte Synovialzellen
	schwach	1	26-50% angefärbte Synovialzellen
	mäßig	2	51-75% angefärbte Synovialzellen
	hoch	3	76-100% angefärbte Synovialzellen
IHC Expression von iNOS in der Synovialmembran			
	keine	0	keine angefärbten Synovialzellen
	schwach	1	1-25% angefärbte Synovialzellen
	mäßig	2	26-50% angefärbte Synovialzellen
	hoch	3	51-100% angefärbte Synovialzellen

Abb. 3.9.2/1: Bewertungstabelle der Hartgewebe

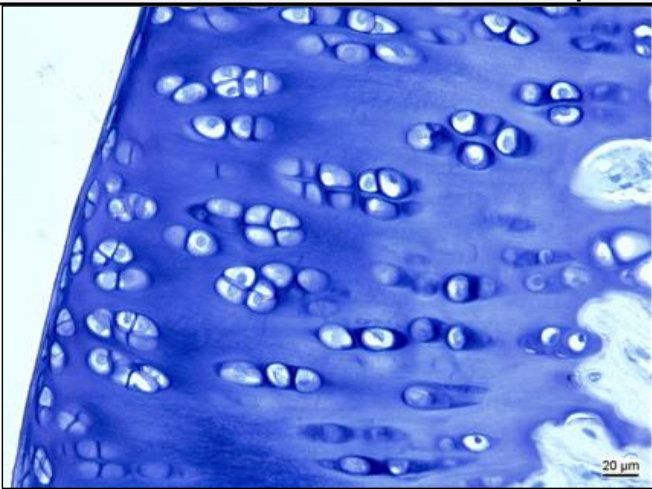
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Tabelle 1)	
Knorpel:	
	<p>Beispielbild pyhsiologischer Aufbau Knorpel: Struktur, Zellen, Tidemark-Integrität, entspricht Bewertungsgrad 0 (Toluidinblau-Färbung, Gelenkknorpel, rechtes Kniegelenk)</p>
	<p>Beispielbild Knorpelstruktur: Risse bis in kalzifizierte Zone, entspricht Bewertungsgrad 5 (Toluidinblau-Färbung, Gelenkknorpel, rechtes Kniegelenk)</p>

Abb. 3.9.2/2: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Knorpel, Tabelle 1)

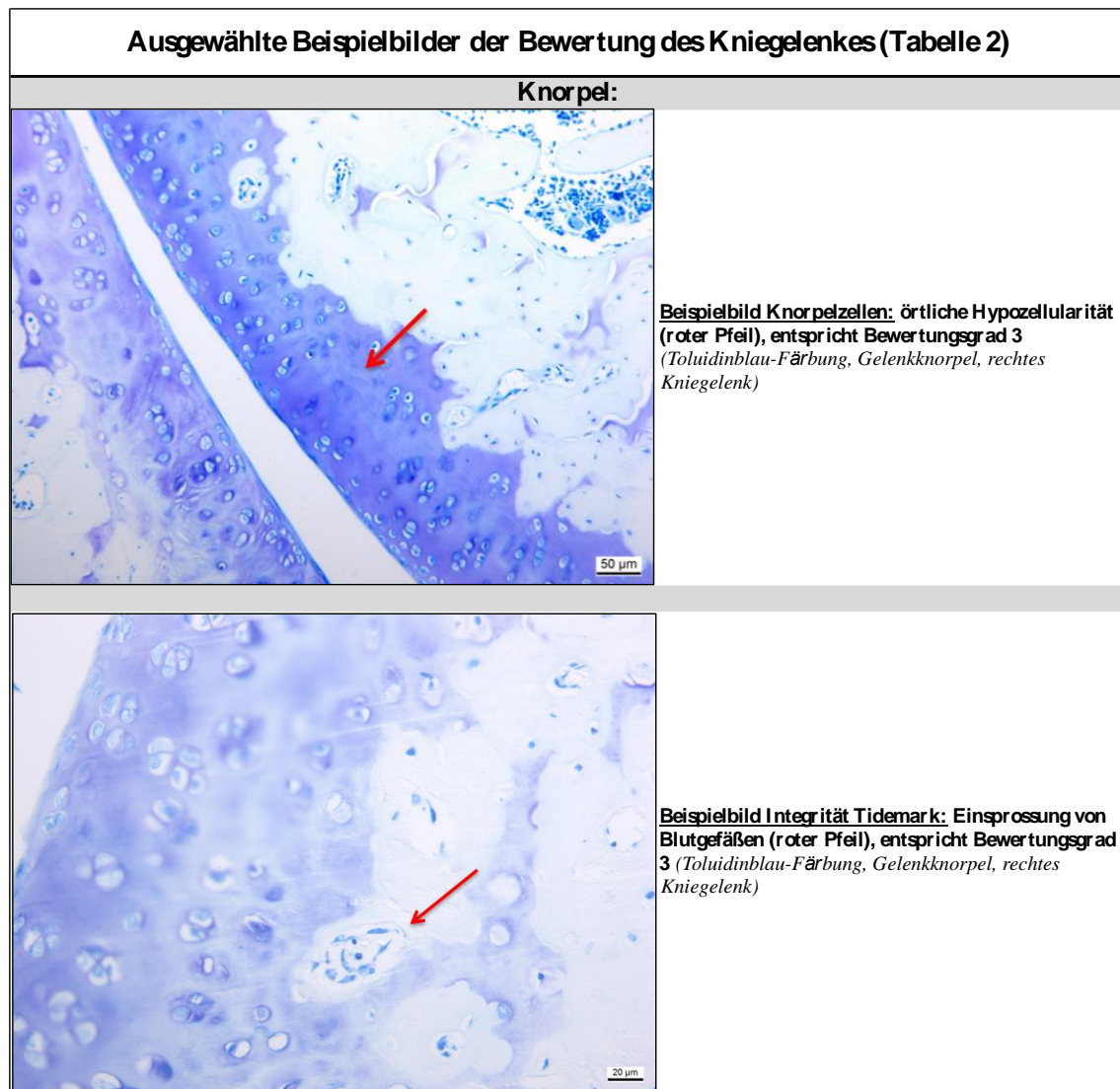


Abb. 3.9.2/3: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Knorpel, Tabelle 2)

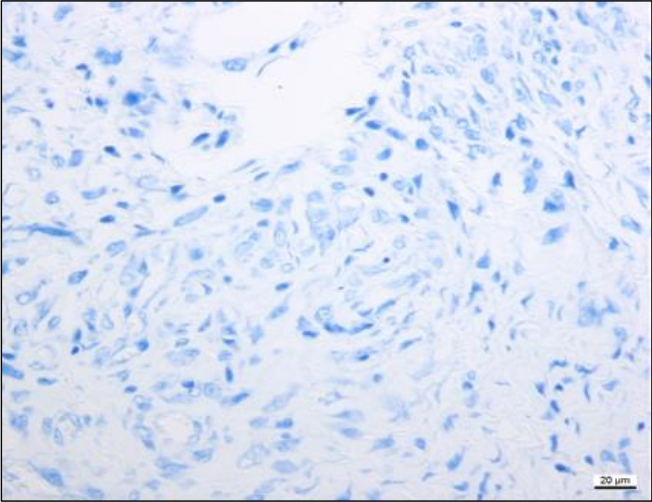
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Tabelle 3)	
histologisches Auftreten injizierter Partikel:	
	<p><u>Beispielbild eines Kniegelenkes ohne Partikelablagerungen</u> (frei oder intrazellulär): entspricht Bewertungsgrad 0 (Toluidinblau-Färbung, Fettkörper, rechtes Kniegelenk)</p>
	<p><u>Beispielbild Partikelablagerungen freie (extrazellulär abgelagerte) Partikel</u> (rote Pfeile): a=Gelenkspalt, b=Synovialmembran, c=Fettkörper, entspricht Bewertungsgrad 2 (für Lokalisation Partikel), Bewertungsgrad 3 (für Menge freier Partikel), Bewertungsgrad 0 (für Menge phagozytierter Partikel) (Toluidinblau-Färbung, Gelenkknorpel, rechtes Kniegelenk)</p>

Abb. 3.9.2/4: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Tabelle 3)

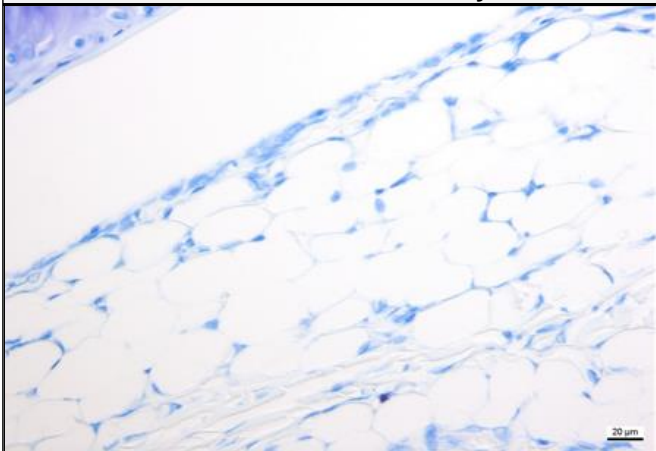
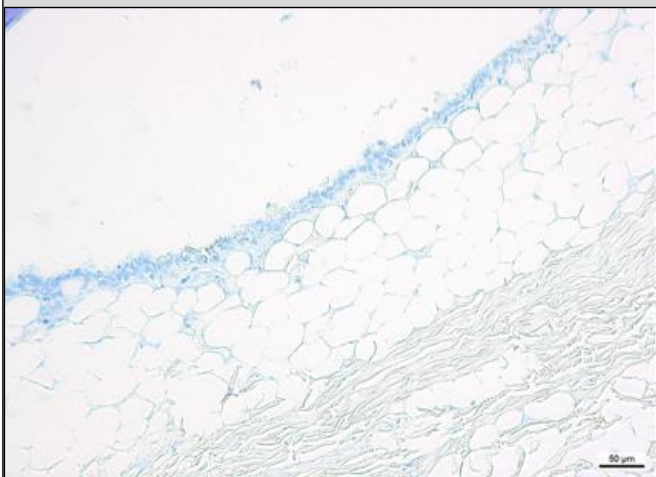
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Tabelle 4)	
Synovialmembran:	
	<p>Beispielbild Synovialmembran mit physiologischer Struktur: entspricht Bewertungsgrad 0 (Toluidinblau-Färbung, Synovialmembran, rechtes Kniegelenk)</p>
	<p>Beispielbild Strukturveränderung Synovialmembran: mehrere Zellschichten/Verdickung der Synovialmembran sowie Einwanderung von Entzündungszellen, entspricht Bewertungsgrad 3 (Toluidinblau-Färbung, Synovialmembran, rechtes Kniegelenk)</p>

Abb. 3.9.2/5: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Synovialmembran)

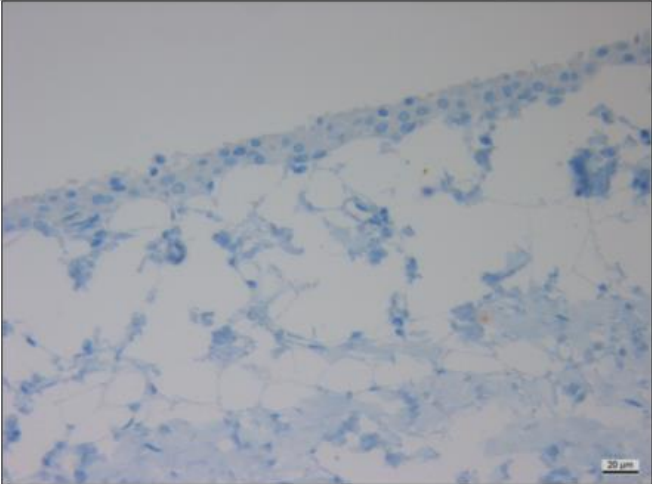
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Tabelle 5)	
Expression iNOS-Antikörperfärbung:	
	<p>Beispielbild pyhsiologischer Aufbau Synovialmembran: keine Synovialzellen agefärbt, entspricht Bewertungsgrad 0 (immunhistochemische iNOS-Antikörperfärbung, Synovialmembran rechtes Kniegelenk)</p>
	<p>Beispielbild aktivierte Synovialmembran: mehr als 51% angefärbte Synovialzellen, entspricht Bewertungsgrad 3 (immunhistochemische iNOS-Antikörperfärbung, Synovialmembran rechtes Kniegelenk)</p>

Abb. 3.9.2/6: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (IHC Färbung der induzierbaren NO-Synthase, iNOS)

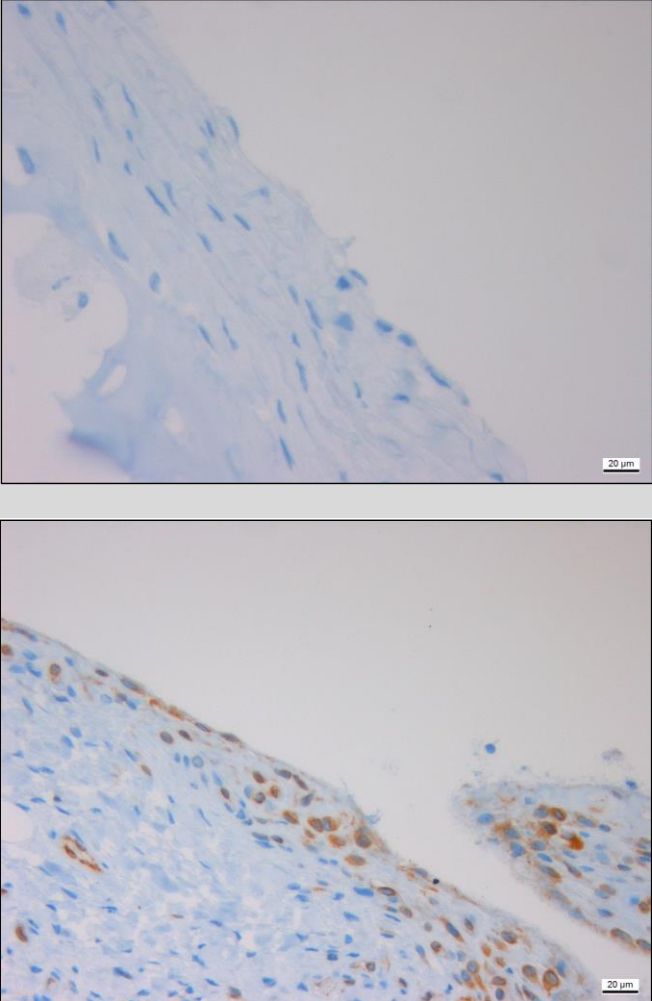
Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (Tabelle 6)	
Expression COX-2 Antikörperfärbung:	
	<p>Beispielbild pyhsiologischer Aufbau Synovialmembran: keine Synovialzellen agefärbt, entspricht Bewertungsgrad 0 (immunhistochemische COX-2-Antikörperfärbung, Synovialmembran rechtes Kniegelenk)</p>
	<p>Beispielbild aktivierte Synovialmembran: mehr als <u>76% angefärbte Synovialzellen, entspricht</u> <u>Bewertungsgrad 3</u> (immunhistochemische COX-2- Antikörperfärbung, Synovialmembran rechtes Kniegelenk)</p>

Abb. 3.9.2/7: Ausgewählte Beispielbilder der Bewertung des Kniegelenkes (IHC-Färbung COX-2)

3.9.3 Statistische Auswertung

Die Daten der Evaluierung wurden mittels des Statistikprogrammes IBM SPSS Statistics (Version 23.0.0.2, IBM Corp.) statistisch ausgewertet. Hierbei wurden zum einen die Hintergliedmassen der linken, unbehandelten Gliedmasse (Negativkontrolle) mit der rechten, behandelten Gliedmasse verglichen (Deskriptive Statistik). Zum anderen wurden die Ergebnisse der Gruppen mit zweitägigem postoperativem Überlebenszeitraum mit der Gruppe mit siebentägigem postoperativem ÜZ, welche jeweils die selbe Behandlung bekamen, miteinander verglichen (Wilcoxon Signed Ranks Test).

4 Resultate

4.1 Tierhaltung

Im Zuge der klinischen Allgemeinuntersuchung bei Ankunft der Tiere, während der Akklimatisation und bei der präoperativen Untersuchung zeigte keines der eingesetzten Tiere klinische Auffälligkeiten.

4.2 Chirurgischer Eingriff

4.2.1 Anästhesie

Sowohl die Narkosetiefe als auch die Schmerzausschaltung war bei jedem Tier zu jedem Zeitpunkt dem Eingriff angemessen. Die erforderliche Narkosetiefe, erkennbar am völligen Bewusstseinsverlust sowie dem Verlust von Tiefensensibilität, Lid- sowie Cornealreflex der Tiere, konnte zu jedem Zeitpunkt des Eingriffes gewährleistet werden. Zudem konnten weder Exzitationen, Anzeichen von Schmerzen noch andere Narkosezwischenfälle beobachtet werden.

4.2.2 Präoperative Massnahmen

Die Aufbereitung der Injektionslösungen zur intraartikulären Injektion mittels Sonizieren und Vortexen der Lösungen verlief unter Einhaltung des vorgegebenen Protokolls. Die vorgegebenen Zeitfenster zwischen Fertigstellung der injektionsfähigen Lösungen und der entsprechenden Injektionen wurden niemals überschritten. Die subkutane Implantation des individuellen Identifikations-Transponders verlief bei jedem Tier ohne Komplikationen.

4.2.3 Intraartikuläre Injektion

Die Injektion der Testlösungen (Si_3N_4) bzw. Referenzlösungen (CoCr) in das rechte Kniegelenk der entsprechenden Tiere verlief, unabhängig von der Art der Injektionslösung oder dem Konzentrationsgrad der Lösung, bei jedem Tier erfolgreich und ohne Zwischenfälle.

Es konnte jeweils die exakt vorgeschriebene Menge in den Gelenksspalt injiziert werden. Die Sterilität des Eingriffs konnte bei jedem Tier zu jeder Zeit der Operation gewährleistet werden.

4.3 Postoperative Phase

Die Aufwachphase sämtlicher Tiere verlief ohne Zwischenfälle. Nach Ablauf des vorgeschriebenen Überwachungszeitraumes waren alle Tiere wieder selbständig steh- und gehfähig und zeigten keinerlei unverhältnismässiges Verhalten. Eine Schonhaltung der operierten Gliedmasse oder eine Schwellung des operierten Gelenkes sowie sonstige pathologische Auffälligkeiten waren nicht feststellbar. Auch in der Zeit bis zur Euthanasie wurden keine besonderen Befunde erhoben.

4.4 Euthanasie

Die Euthanasien sämtlicher Tiere verliefen erfolgreich und komplikationslos sowie ohne unvorhergesehene Zwischenfälle wie Exzitationen oder sichtbare Unruhe oder übermässigen Stress der Tiere.

4.5 Tierkörpertransport

Während der gesamten Transportzeit verblieb die Transportbox geschlossen und die Aufrechterhaltung der Temperatur zur Kühlung der Tierkörper innerhalb der Box konnte jederzeit gewährleistet werden.

4.6 Probengewinnung und Fixation der entnommenen Gewebeproben

4.6.1 Entnahme der Weichteilgewebe

4.6.1.1 Leber, Milz, Nieren

Die Entnahme von Leber, Milz sowie beider Nieren sämtlicher Tiere verlief erfolgreich und ohne Komplikationen. Makroskopisch waren keine Veränderungen sichtbar.

4.6.1.2 Regionale Lymphknoten

Die Entnahme der inguinalen- sowie poplitealen Lymphknoten verlief erfolgreich und ohne Komplikationen. Vereinzelt konnten makroskopische Veränderungen der Lymphknoten festgestellt werden (siehe Abb. 4.6.1.2/1).

Lymphknoten		
Tier-Nummer:	Gewebe/Lokalisation:	Makroskopische Veränderung:
4	Inguinallymphknoten/rechts	vergrößert
7	Inguinallymphknoten/rechts	vergrößert
30	Inguinallymphknoten/rechts	vergrößert
31	Inguinallymphknoten/rechts	vergrößert
	Popliteallymphknoten/rechts	vergrößert
33	Inguinallymphknoten/rechts	vergrößert
35	Inguinallymphknoten/rechts	hämorrhagisch/imbibiert
47	Inguinallymphknoten/rechts	vergrößert

Abb. 4.6.1.2/1: Makroskopische Veränderungen der regionalen Kniegelenkslymphknoten zum Entnahmezeitpunkt

4.6.2 Entnahme der Kniegelenke

Bei einigen Tieren waren die Synovialflüssigkeit (Menge, Aussehen) und/oder die Synovialmembran verändert (siehe Abb. 4.6.2/1).

Gelenksflüssigkeit		
Tier-Nummer:	Gewebe/Lokalisation:	Makroskopische Veränderung:
7	Synovial/Kniegelenk/rechts	schwarze Partikel, aggregiert
20	Innenseite Synovialmembran/Kniegelenk/rechts	schwarze Partikel, aggregiert
37/40	Synovial/Kniegelenk/rechts	vermehrte Gelenksflüssigkeit
42/46	Synovial/Kniegelenk/rechts	vermehrte Gelenksflüssigkeit

Abb. 4.6.2/1: Makroskopische Veränderungen von Kniegelenksstrukturen zum Entnahmezeitpunkt

4.7 Probenaufbereitung

Alle Kniegelenkproben konnten erfolgreich und komplikationslos entkalkt, entwässert und eingebettet werden. Mit Ausnahme vereinzelter regionaler Kniegelenklymphknoten, die aufgrund ihrer geringen Grösse beim Schneidevorgang nicht oder nur unvollständig auf die Objektträger übertragen werden konnten verlief die Herstellung der Dünnschnitte sämtlicher Weichteilgewebeproben erfolgreich (siehe Abb. 4.7/1).

histologisch nicht auswertbare Dünnschnitte	
Tier-Nummer:	Gewebe/Lokalisation:
1	Popliteallymphknoten/rechts
	Inguinallymphknoten/rechts
13	Popliteallymphknoten/links
	Inguinallymphknoten/rechts
	Inguinallymphknoten/links
15	Inguinallymphknoten/rechts
16	Inguinallymphknoten/rechts
19	Popliteallymphknoten/links
21	Inguinallymphknoten/rechts
	Inguinallymphknoten/links
25	Inguinallymphknoten/links
30	Popliteallymphknoten/rechts
	Inguinallymphknoten/links
34	Inguinallymphknoten/links
36	Inguinallymphknoten/links
39	Inguinallymphknoten/rechts
40	Popliteallymphknoten/rechts
42	Inguinallymphknoten/rechts
47	Inguinallymphknoten/links
48	Popliteallymphknoten/rechts
	Popliteallymphknoten/links
	Inguinallymphknoten/links

Abb. 4.7/1: Technisch nicht herstellbare Dünnschnitte

4.8 Histologische Evaluation und statistische Aufarbeitung

Die Dünnschnitte der entnommenen Gewebe (Milz, Leber, Nieren, Popliteal- und Inguinallymphknoten sowie Kniegelenke) wurden lichtmikroskopisch untersucht und die Veränderungen nach gewebespezifischen Bewertungs-Schemata evaluiert.

Um zu ermitteln, ob die Injektion der eingesetzten Substanzen einen Einfluss auf die jeweiligen Gewebestrukturen hatte, wurden die Werte der rechten (behandelten) mit denen der linken (unbehandelten) Gliedmassen (Kniegelenke, Popliteal- und Inguinallymphknoten) sowie der linken und der rechten Niere verglichen (siehe Anhang, Tab. 10.1/1 „Mittelwerte des Vergleiches der Gewebe von rechten und linken Hintergliedmassen sowie der rechten und linken Nieren (Deskriptive Statistik)“ sowie Anhang Tab. 10.1/2 „Signifikanzen des Vergleiches der Gewebe von rechter und linker Hintergliedmassen sowie der rechten und linken Nieren (Wilcoxon Signed Ranks Test“)). Dabei wurden jeweils die rechten Kniegelenke entweder mit der Testsubstanz T (Si_3N_4) oder der Referenzsubstanz R (CoCr) behandelt; die unbehandelten linken Kniegelenke dienten als Kontrolle. Die Indizes „low“ oder „high“ bezeichneten jeweils die in das Kniegelenk injizierten niedrigen bzw. hohen Konzentrationen der Testsubstanz bzw. der Referenzsubstanz.

Zur Beurteilung einer möglichen, *zeitabhängigen* Entwicklung von histopathologischen Gewebeveränderungen diente ein Vergleich zwischen zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum (siehe Anhang, Tab. 10.1/3 „Tabelle Signifikanzen Vergleich 2 und 7 Tage“).

Als statistisch signifikant galten Werte von $p \leq 0.05$.

4.8.1 Evaluierung der Kniegelenke

Kniegelenk: Bei der histologischen Beurteilung der Kniegelenkstrukturen wurde ein modifizierter Mankin-Score angewendet (siehe Abb. 3.9.2/1: Bewertungstabelle der Hartgewebe, Abschnitt Material und Methoden). Eine Ausnahme hiervon bildet das Bewertungskriterium „Anzahl von Mastzellen im Fettkörper“ innerhalb der Kniegelenke. Dieses Kriterium wurde nicht nach dem modifizierten Mankin-Score beurteilt, sondern die absolute Anzahl von Mastzellen innerhalb des mikroskopisch begutachteten Bereiches ausgezählt, ohne den Ergebnissen Bewertungsgrade zuzuordnen.

4.8.1.1 Kriterium: Knorpelzellen

Mögliche histopathologische Auffälligkeiten waren eine diffuse Hyperzellularität (Bewertungsgrad 1) sowie das Auftreten von Zellklonen (Bewertungsgrad 2). Hier ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Test- und Referenzsubstanz bzw. zwischen behandelten und unbehandelten Gelenken.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die durchschnittlichen Einzelwerte für dieses Kriterium lagen zwischen 0 und 2.

Mittelwerte:

Femur 1R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,833 (RI High 7d und TI High 2d) und maximal 1,833 (TI High 7d).

Femur 1L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (TI Low 2d) und maximal 1,833 (RI Low 2d).

Femur 2R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,667 (RI Low 2d) und maximal 2,000 (RI High 2d).

Femur 2L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,500 (RI Low 7d) und maximal 1,833 (RI High 7d).

Tibia R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (TI Low 7d) und maximal 1,333 (TI High 2d).

Tibia L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (RI Low 2d, RI Low 7d sowie TI Low 2d) und maximal 0,500 (RI High 2d, TI High 2d sowie TI High 7d).

Statistische Signifikanzen

Für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen ergaben sich für dieses Bewertungskriterium und diese Gewebe keine signifikanten Unterschiede.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich eine statistische Signifikanz für die Behandlung mit RI Low ($p=0,026$) bei Gewebelokalisation Femur 1 des linken Kniegelenkes, wobei hier der Wert für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

4.8.1.2 Kniegelenksknorpel: Tidemark

Mögliche histopathologische Auffälligkeiten, waren die Einsprossung von Blutgefäßen (Bewertungsgrad 1), Hyperzellularität (Bewertungsgrad 2) sowie eine Hypozellularität (Bewertungsgrad 3) im Bereich der Knorpel-Tidemark. Zwischen allen Behandlungsgruppen und den unbehandelten Gelenken waren keine Unterschiede nachzuweisen.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die durchschnittlichen Einzelwerte für dieses Kriterium lagen zwischen 0 und 3.

Femur 1R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (sämtliche Behandlungsgruppen ausschliesslich Behandlungsgruppe TI Low 2d) und maximal 0,167 (TI Low 2d).

Femur 1L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (sämtliche Behandlungsgruppen ausschliesslich Behandlungsgruppe RI Low 7d) und maximal 0,167 (RI Low 7d).

Femur 2R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (für sämtliche Behandlungsgruppen ausschliesslich RI Low 7d und TI Low 7d) und maximal 0,167 (RI Low 7d und TI Low 7d).

Femur 2L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen bei allen untersuchten Behandlungsgruppen bei einem Bewertungsgrad von 0,000.

Tibia R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (für sämtliche Behandlungsgruppen ausschliesslich RI High 7d) und maximal 0,167 (RI High 7d).

Tibia L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (für sämtliche Behandlungsgruppen ausschliesslich RI High 2d) und maximal 0,167 (RI High 2d).

Statistische Signifikanzen:

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich weder für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum statistisch signifikante Unterschiede.

4.8.1.3 Kniegelenk: Knorpelstruktur

Mögliche histopathologische Auffälligkeiten waren Oberflächen-Irregularitäten (Bewertungsgrad1), Pannus mit Oberflächen-Irregularitäten (Bewertungsgrad 2), Risse

bis in die Übergangszone des Knorpels (Bewertungsgrad 3), Risse bis in die radiäre Zone (Bewertungsgrad 4), Risse bis in die kalzifizierte Zone (Bewertungsgrad 5) sowie eine komplette Desorganisation der Knorpelstruktur (Bewertungsgrad 6). Gesamthaft waren hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen sowie zwischen behandelten und unbehandelten Gelenken vorhanden.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelwerte lagen zwischen 0 und 6.

Mittelwerte:

Femur 1R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (RI Low 7d und TI Low 2d) und maximal 1,167 (TI High 7d).

Femur 1L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (RI Low 7d) und maximal 1,167 (TI High 2d und TI High 7d).

Femur 2R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,333 (für RI High 7d und RI Low 2d) und maximal 0,500 (TI Low 2d).

Femur 2L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (für RI Low 2d) und maximal 1,167 (für TI High 2d).

Tibia R: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,333 (RI Low 2d und TI High 2d) und maximal 1,500 (TI High 7d).

Tibia L: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (für RI Low 2d) und maximal 1,167 (TI Low 2d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich weder für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch

für den Vergleich der Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum statistisch signifikante Unterschiede.

4.8.1.4 Kniegelenk: Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln

Mögliche histopathologische Auffälligkeiten waren eine Gesamtanzahl von 1 bis 5 Zellen innerhalb des histologisch ausgewerteten Bereiches (Bewertungsgrad 1), 6 bis 10 Zellen innerhalb des ausgewerteten Bereiches (Bewertungsgrad 2) bzw. mehr als 10 Zellen mit phagozytierten Partikeln innerhalb des ausgewerteten Bereiches (Bewertungsgrad 3). In den behandelten Gelenken wurden jeweils phagozytierte Partikel gefunden, im Unterschied zu den unbehandelten Gelenken, in denen keine phagozytierten Partikel nachgewiesen wurden.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen lagen zwischen Score 0 und 3.

Mittelwerte:

Kniegelenk rechts: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (TI Low 2d) und maximal 2,167 (RI Low 7d).

Kniegelenk Links: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen für alle Behandlungsgruppen bei 0,000.

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen statistische Signifikanzen für die Behandlungsgruppe RI Low 7d ($p=0,038$), TI High 2d ($p=0,041$) sowie TI High 7d ($p=0,041$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Kniegelenke höher ausfielen als die der korrespondierenden linken Kniegelenke.

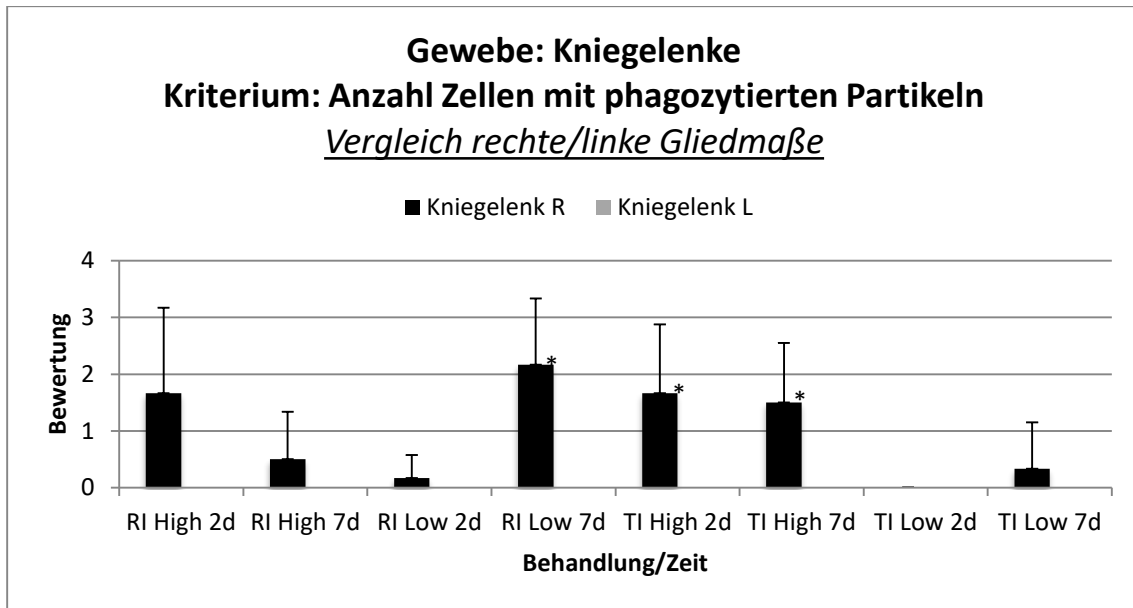


Abb. 4.8.1.4/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln innerhalb der Kniegelenke; * entspricht $p \leq 0,05$. In keinem der linken Kniegelenke wurden Zellen mit phagozytierten Partikeln gefunden.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für die Behandlung der rechten Gliedmassen mit RI Low eine statistische Signifikanz ($p = 0,012$), wobei hier der Wert für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Generell kann festgehalten werden, dass die Kniegelenke der linken Hintergliedmasse keine Zellen mit phagozytierten Partikeln enthielten, wohingegen alle Kniegelenke der rechten Hintergliedmasse Zellen mit phagozytierten Partikeln aufwiesen mit Ausnahme der Gruppe TI Low 2d.

4.8.1.5 Synovialmembran: Cyclooxygenase 2 (COX-2) Expression

Die COX-2 Expression wurde semiquantitativ bewertet: 26% -50% angefärbte Synovialzellen (Bewertungsgrad 1), 51% - 75% angefärbte Synovialzellen (Bewertungsgrad 2) sowie 76% - 100% angefärbte Synovialzellen (Bewertungsgrad 3). Bei der COX-2 Expression der Synovialmembran waren zwischen behandelten und unbehandelten Gelenken keine Unterschiede festzustellen.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Einzelwerte für die COX-2 Expression in der Synovialmembran lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Kniegelenk Rechts: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0,333 (RI Low 7d) und maximal 1,833 (TI High 7d).

Kniegelenk Links: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 1,000 (RI Low 7d und TI Low 7d) und maximal 1,667 (TI High 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich weder für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch für den Vergleich der Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum statistisch signifikante Unterschiede.

4.8.1.6 Kniegelenk-Fettkörper: Entzündungszellen

Bewertungskriterien waren das Auftreten von einzelnen Entzündungszellen (Bewertungsgrad 1), das Auftreten von unregelmässig verstreuten Entzündungszellen (Bewertungsgrad 2) sowie eine deutlich sichtbare Infiltration mit Entzündungszellen bei gleichzeitiger Fibrosierungstendenz (Bewertungsgrad 3). Die mit der Referenzsubstanz behandelten Kniegelenke hatten im Fettkörper eine höhere Anzahl Entzündungszellen als die mit der Testsubstanz behandelten Gelenke.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Kniegelenk Rechts: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,167 (TI Low 7d) und maximal 1,667 (RI Low 7d).

Kniegelenk Links: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (RI High 2d, RI High 7d, TI High 2d, TI Low 2d) und maximal 0,167 (RI Low 2d, RI Low 7d, TI High 7d, TI Low 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen statistische Signifikanzen für die Behandlungsgruppe RI Low 2d ($p=0,038$), TI High 2d ($p=0,046$) sowie TI Low 2d ($p=0,046$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Kniegelenke höher ausfielen als die der korrespondierenden linken Kniegelenke.

Die Fettkörper der rechten Kniegelenke innerhalb dieser Gruppen wiesen signifikant höhere Bewertungsgrade auf als die linken Kniegelenke der Tiere dieser Gruppen.

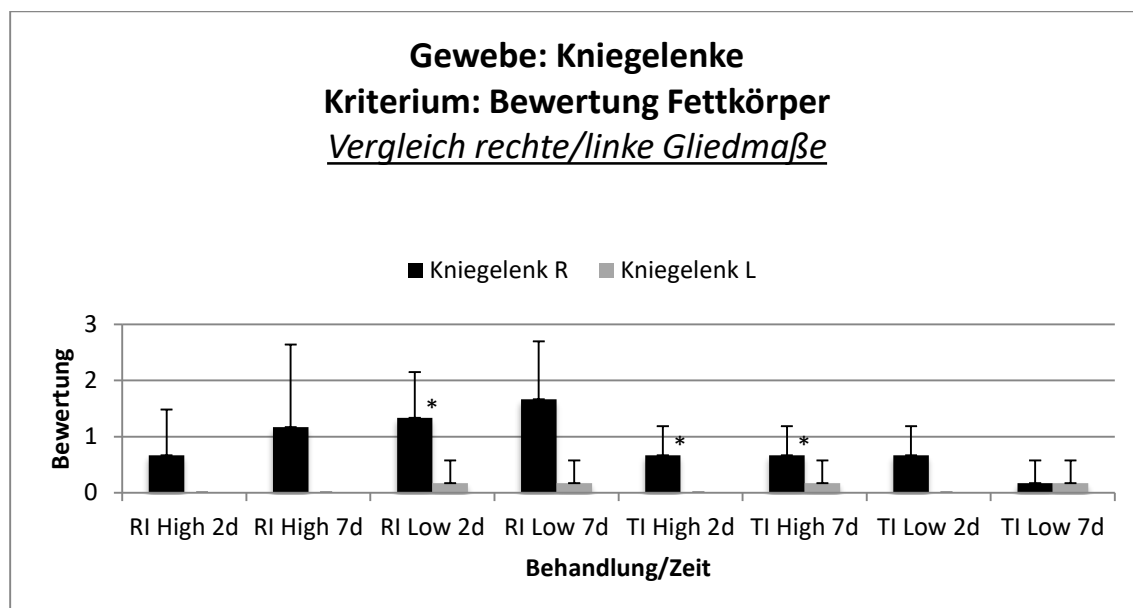


Abb. 4.8.1.6/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Bewertung der Fettkörper der jeweiligen Kniegelenke; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Generell zeigten die rechten Kniegelenke sämtlicher Gruppen, mit Ausnahme der Gruppe TI Low 7d, im Vergleich zu den jeweiligen linken Kniegelenken deutlich höhere Bewertungsgrade.

Die Fettkörper des linken Knies der Gruppen RI High 2d, RI High 7d, TI High 2d sowie TI Low 2d zeigten keine histopathologischen Auffälligkeiten.

Insgesamt zeigten die Gruppen, die mit der Referenzsubstanz behandelt wurden, höhere Bewertungsgrade als die Gruppen, welche mit der Testsubstanz behandelt wurden.

4.8.1.7 Kniegelenk: Anzahl von freien Partikeln

Bewertungskriterien waren das Auftreten von einzelnen freien (nicht inkorporierten) Partikeln (Bewertungsgrad 1), das Auftreten von unregelmässig verstreuten freien Partikeln (Bewertungsgrad 2) sowie lokale Anhäufungen von freien Partikeln (Bewertungsgrad 3). Freie Partikel konnten nur in den behandelten Gelenken und vor allem bei denen mit der Referenzsubstanz und nur in einer Gruppe mit der Testsubstanz nachgewiesen werden.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelwerte für die Anzahl von freien Partikeln lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Kniegelenk Rechts: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0,000 (TI High 2d, TI High 7d sowie TI Low 7d) und maximal 2,000 (RI High 2d).

Kniegelenk Links: Die Mittelwerte lagen bei allen Behandlungsgruppen bei 0,000.

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen statistisch signifikante Unterschiede für die Behandlungsgruppe RI High 2d ($p = 0,046$) sowie RI Low 7d ($p = 0,034$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Kniegelenke höher ausfielen als die der korrespondierenden linken Kniegelenke.

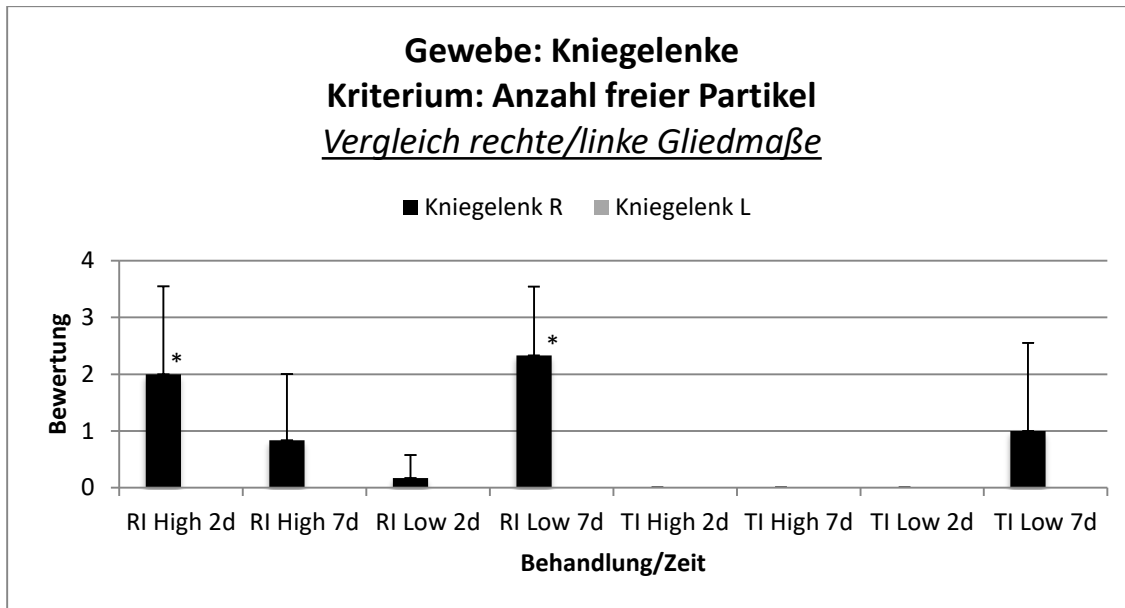


Abb. 4.8.1.7/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Anzahl freier Partikel innerhalb der jeweiligen Kniegelenke; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für die Behandlung der rechten Gliedmassen mit RI Low eine statistische Signifikanz ($p=0,011$), wobei hier der Wert für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Generell konnten in sämtlichen untersuchten Gruppen innerhalb der linken Kniegelenke keine freien Partikel nachgewiesen werden. Innerhalb der rechten Kniegelenke gab es erhebliche Unterschiede bezüglich der Anzahl an freien Partikeln zwischen den Versuchsgruppen. So konnten in Gruppe TI High 2d, TI High 7d sowie TI Low 2d auch in den rechten Kniegelenken keine freien Partikel nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnten in den Gruppen RI High 2d, RI High 7d, RI Low 2d, RI Low 7d sowie TI Low 7d jeweils freie Partikel in den rechten Kniegelenken nachgewiesen werden.

4.8.1.8 Synovialmembran: Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Bewertungskriterien für die immunhistochemischen iNOS-Expression innerhalb des Kniegelenkes im Bereich der Synovialmembran waren: 1% - 25% angefärbte Synovialzellen (Bewertungsgrad 1), 26% - 50% angefärbte Synovialzellen (Bewertungsgrad 2) sowie 51% - 100% angefärbte Synovialzellen (Bewertungsgrad 3).

Die Expression der iNOS war in den behandelten Gelenken meist stärker als in den unbehandelten Gelenken. In den behandelten Gelenken war die Reaktion für beide Substanzen ähnlich.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelwerte für die iNOS-Expression in den Synovialmembranen lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Kniegelenk Rechts: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0,333 (RI High 7d) und maximal 1,667 (TI High 7d).

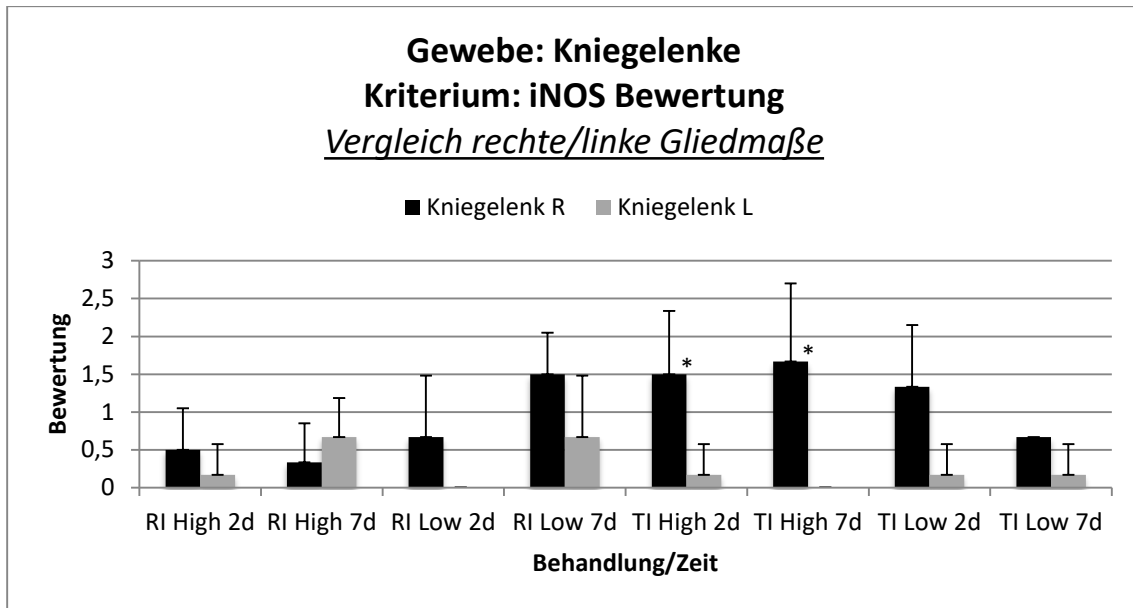
Kniegelenk Links: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0,000 (RI Low 2d und TI High 7d) und maximal 0,667 (RI High 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede für die Behandlungsgruppe TI High 2d ($p=0,038$) sowie für die Behandlungsgruppe TI High 7d ($p=0,039$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Kniegelenke höher ausfielen als die der linken.

Die rechten Kniegelenke innerhalb dieser Gruppen wiesen deutlich stärkere iNOS-Antikörperreaktionen als die korrespondierenden linken Kniegelenke auf.

Mit Ausnahme der Gruppe RI High 7d, in welcher die linken Synovialmembranen etwas stärkere Reaktionen zeigten als die rechten, waren in sämtlichen anderen Gruppen die Reaktionen in den rechten Kniegelenken deutlich stärker ausgeprägt. In den Gruppen RI Low 2d sowie TI High 7d zeigten die Synovialmembranen der linken Kniegelenke keine iNOS-Antikörperreaktion.



*Abb. 4.8.1.8/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Bewertung der iNOS-Antikörperreaktion innerhalb der Synovialmembranen der Kniegelenke; * entspricht $p \leq 0,05$*

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergaben sich für dieses Bewertungskriterium kein signifikanter Unterschied. Die Bewertungen der rechten Kniegelenke innerhalb der Gruppen, welche die Testsubstanz injiziert bekamen, fiel generell höher aus als die der Gruppen, welche die Referenzsubstanz injiziert bekamen.

4.8.1.9 Kniegelenks-Fettkörper: Anzahl Mastzellen

Die Ergebnisse für dieses Kriterium (Mittelwerte, statistische Signifikanzen) basierten auf der absoluten Anzahl von mikroskopisch auszählbaren Mastzellen innerhalb des ausgewerteten Bereiches (Fettkörper des jeweiligen Kniegelenkes). Die Zahl der gefundenen Mastzellen war in den behandelten und unbehandelten Gelenken jeweils ähnlich.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

In den Kniegelenk-Fettkörpern wurden zwischen 0 und 30 Mastzellen gefunden.

Kniegelenk Rechts: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 8,000 (RI Low 2d) und maximal 16,667 (RI Low 7d).

Kniegelenk Links: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 5,833 (TI High 2d und TI Low 2d) und maximal 15,833 (RI Low 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen keine statistische Signifikanz.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergaben sich statistische Signifikanzen bei der Behandlung des linken Kniegelenks mit RI High ($p=0,045$) und der Behandlung mit TI Low ($p=0,005$), wobei hier der Wert für den jeweils siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den jeweils zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

4.8.1.10 Kniegelenk: Lokalisation von Partikelablagerungen

Bewertungskriterien waren: An Makrophagen gebundene Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 1), freie, ungebundene Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 2) sowie an Makrophagen gebundene *und* frei vorkommende Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 3). Hier wurden nur Partikel in den behandelten Gelenken gefunden, und zwar in den mit CoCr behandelten Gelenken in grösserer Zahl als in den mit Si3N4 behandelten.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelwerte für dieses Kriterium lagen zwischen 0 und 3.

Kniegelenk Rechts: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (TI Low 2d) und maximal 2,500 (RI Low 7d).

Kniegelenk Links: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen bei jeder Behandlungsgruppe bei 0,000.

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen eine statistische Signifikanz für die Behandlungsgruppe RI High 2d ($p=0,046$), für die Behandlungsgruppe RI Low 7d ($p=0,025$), für die Behandlungsgruppe TI High 2d ($p=0,025$) sowie für die Behandlungsgruppe TI High 7d ($p=0,025$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Kniegelenke höher ausfielen als die der korrespondierenden linken Kniegelenke.

Innerhalb dieser Behandlungsgruppen war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lokalisation von Partikelablagerungen erkennbar. Die Werte der rechten Kniegelenke dieser Gruppen waren deutlich höher als die der korrespondierenden linken Kniegelenke, welche innerhalb dieser Gruppen keine Partikelablagerungen aufwiesen.

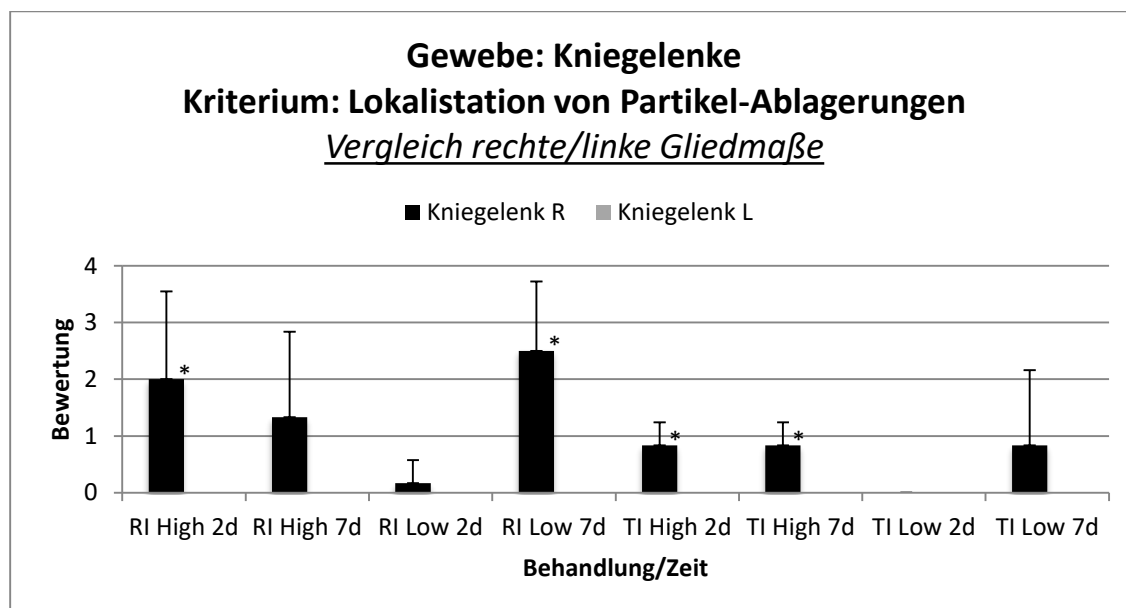


Abb. 4.8.1.10/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Lokalisation von Partikel-Ablagerungen innerhalb der Kniegelenke; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich eine statistische Signifikanz bei der Behandlung des rechten Kniegelenks mit RI Low ($p=0,010$), wobei hier der Wert für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Generell wiesen die linken Kniegelenke innerhalb sämtlicher Gruppen keinerlei Partikelablagerungen auf, wohingegen die rechten Kniegelenke deutliche Ablagerungen

zeigten, mit Ausnahme der Gruppen RI Low 2d (kaum Ablagerungen innerhalb der rechten Kniegelenken) sowie TI Low 2d (keine Ablagerungen in den rechten Kniegelenken).

4.8.1.11 Synovialmembran: Struktur

Histopathologische Bewertungskriterien waren: Leichte Strukturveränderungen mit zwei Zellschichten und einer Verdickung der Membran (Bewertungsgrad 1), moderate Strukturveränderungen mit mehr als zwei Zellschichten (Bewertungsgrad 2) sowie deutlich sichtbare Strukturveränderungen, mit zusätzlicher, deutlich sichtbarer Infiltration durch Entzündungszellen (Bewertungsgrad 3). Die Synovialmembranen der injizierten Gelenke enthielten mehr Entzündungszellen als die der unbehandelten Gelenke.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Einzelbewertungen für dieses Kriterium lagen zwischen Grad 0 und 3.

Mittelwerte:

Kniegelenk Rechts: Die Mittelwerte lagen zwischen 0,833 (RI High 2d) und 1,500 (RI Low 2d sowie TI High 7d).

Kniegelenk Links: Die Mittelwerte lagen zwischen 0,167 (TI Low 7d sowie RI High 2d) und 1,333 (TI High 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen ein signifikanter Unterschied für die Behandlungsgruppe RI High 2d ($p=0,046$) sowie für die Behandlungsgruppe TI Low 7d ($p=0,034$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Kniegelenke höher ausfielen als die der korrespondierenden linken Kniegelenke.

Innerhalb dieser Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede im Vergleich der Bewertung von rechter und linker Synovialmembran der Tiere dieser Gruppen. Beide Behandlungsgruppen zeigten signifikant höhere Werte für die Synovialmembranen der rechten Kniegelenke.

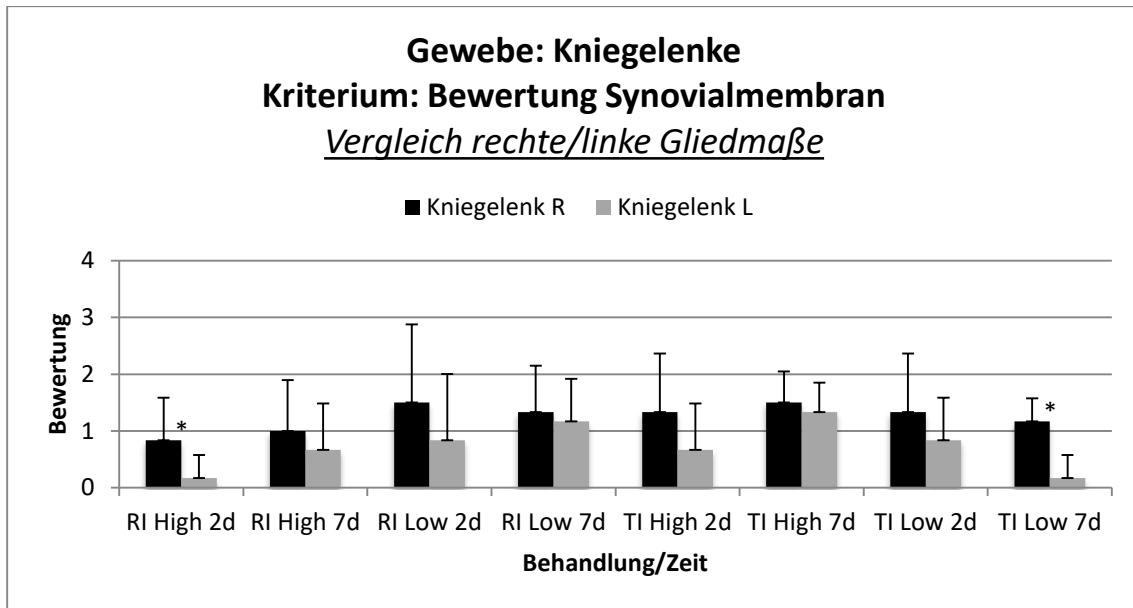


Abb. 4.8.1.11/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Bewertung der Synovialmembran der Kniegelenke; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergaben sich für dieses Bewertungskriterium keine signifikanten Unterschiede..

Generell ergaben sich für alle untersuchten Gruppen höhere Werte für die jeweils rechten im Vergleich zu den linken Synovialmembranen.

4.8.2 Popliteallymphknoten

Bei der Beurteilung der histologischen Strukturen der Popliteallymphknoten wurde ein speziell für die Fragestellung dieser Studie angefertigtes Bewertungsschema zugrunde gelegt (siehe Abb. 3.9.1/1: Bewertungstabelle der Weichteilgewebe, Abschnitt Bewertungstabelle Lymphknoten). In den histologischen Strukturen der Kniekehlymphknoten sowie in den dort gefundenen phagozytierten Partikeln waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seiten der injizierten und der unbehandelten Gelenke gefunden worden.

4.8.2.1 Popliteallymphknoten: Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln

Die Zellen mit phagozytierten Partikeln wurden gezählt und bewertet: Eine bis fünf Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 1), sechs bis 10 Zellen mit

intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 2) sowie mehr als 10 Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 3).

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen für „Anzahl von phagozytierten Partikeln innerhalb der Popliteallymphknoten“ lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte

Popliteallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0,167 (RI Low 7d) und maximal 2,167 (RI High 7d).

Popliteallymphknoten Links: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0,667 (TI Low 2d) und maximal 1,833 (TI High 7d sowie TI Low 7d).

Statistische Signifikanzen

Der Vergleich zwischen rechtem und linke Popliteallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen ergab keine signifikanten Unterschiede.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für den Popliteallymphknoten der rechten Hintergliedmasse eine statistische Signifikanz für die Behandlung mit RI Low ($p=0,008$) sowie für die Behandlung mit TI High ($p=0,036$), wobei hier der Wert für den jeweils zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den jeweils siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

4.8.2.2 Popliteallymphknoten: Anzahl von freien Partikeln

Kriterien für den Grad der histologischen Bewertung der Anzahl von freien, also extrazellulären und nicht zellgebundenen Partikeln innerhalb der Popliteallymphknoten waren: Vereinzelt auftretende extrazelluläre Partikel (Bewertungsgrad 1), unregelmässig verstreute extrazelluläre Partikel (Bewertungsgrad 2) sowie lokale Anhäufungen von extrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 3). Freie Partikel wurden fast ausschliesslich in den Lymphknoten der injizierten Gelenke gefunden.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen für „Anzahl von freien Partikeln innerhalb der Popliteallymphknoten“ lag zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Popliteallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0,000 (RI High 7d, RI Low 7d, TI High 7d sowie TI Low 7d) und maximal 1,000 (RI Low 2d).

Popliteallymphknoten Links: Die Mittelwerte lagen für alle Behandlungsgruppen bei 0.

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Popliteallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen ein signifikanter Unterschied für die Behandlungsgruppe RI Low 2d ($p=0,046$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Popliteallymphknoten höher ausfielen als die der linken Popliteallymphknoten.

Die Bewertungsgrade für die rechten Popliteallymphknoten waren signifikant höher als die der linken innerhalb dieser Gruppe, in welchen keine freien Partikel nachgewiesen werden konnten.

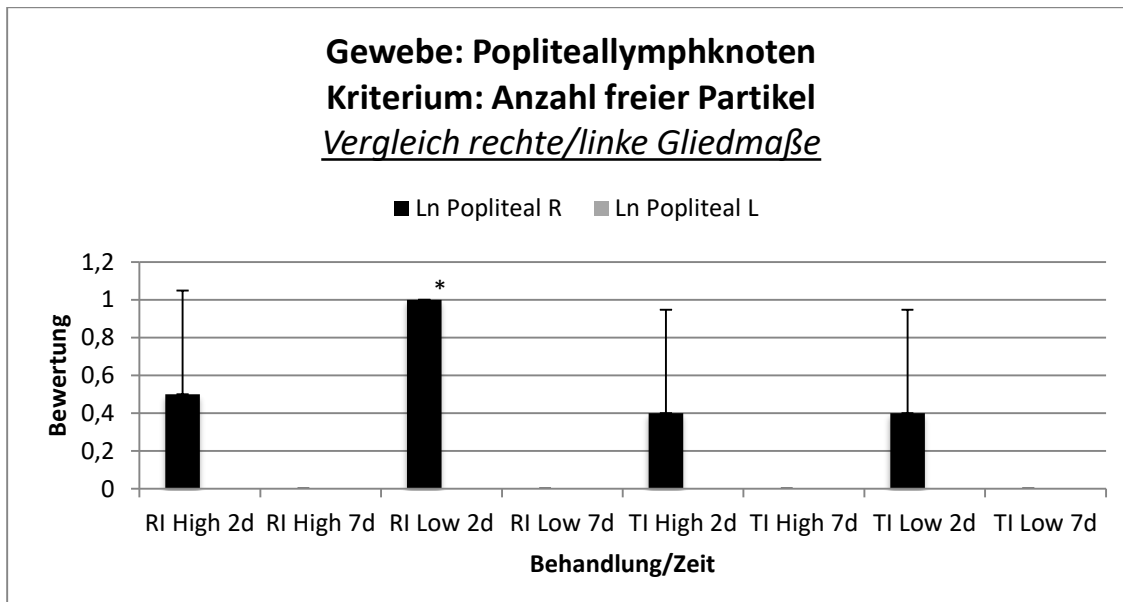


Abb 4.8.2.2/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Anzahl freier Partikel innerhalb der Popliteallymphknoten; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für die rechten Popliteallymphknoten ein signifikanter Unterschied für die Behandlung mit RI Low ($p=0,003$), wobei hier der Wert für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Generell konnten in sämtlichen untersuchten Gruppen innerhalb der linken Popliteallymphknoten keine freien Partikel nachgewiesen werden.

Innerhalb der rechten Popliteallymphknoten gab es erhebliche Unterschiede der Anzahl an freien Partikeln zwischen den Versuchsgruppen. So konnten in Gruppe RI High 7d, RI Low 7d, TI High 7d sowie TI Low 7d in den Popliteallymphknoten beider Seiten keine freien Partikel nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten in den Gruppen RI High 2d, RI Low 2d, TI High 2d sowie TI Low 2d, in den rechten Popliteallymphknoten freie Partikel nachgewiesen werden.

4.8.2.3 Popliteallymphknoten: Lokalisation von Partikelablagerungen

Bewertungskriterien waren: An Makrophagen gebundenen Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 1), freie, also nicht-zellgebundene Ablagerungen von Partikeln (Bewertungsgrad 2) sowie freie *und* an Makrophagen gebundene Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 3). Die an Makrophagen gebundenen sowie freien Partikel waren in den rechten Kniekehllymphknoten meist häufiger als in den linken.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen für „Lokalisation von Partikelablagerungen innerhalb der Popliteallymphknoten“ lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Popliteallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,167 (RI Low 7d) und maximal 3,000 (RI Low 2d).

Popliteallymphknoten Links: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,333 (TI Low 2d) und maximal 1,000 (RI High 2d sowie TI High 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Popliteallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen ein signifikanter Unterschied in der Behandlungsgruppe RI Low 2d ($p=0,046$), wobei innerhalb dieser Gruppen die Werte der Gewebe der rechten Popliteallymphknoten höher ausfielen als die der korrespondierenden linken Popliteallymphknoten.

Die rechten Popliteallymphknoten zeigten signifikant höhere Werte hinsichtlich der Bewertung der Lokalisation der Partikelablagerungen als die linken Popliteallymphknoten innerhalb dieser Gruppe.

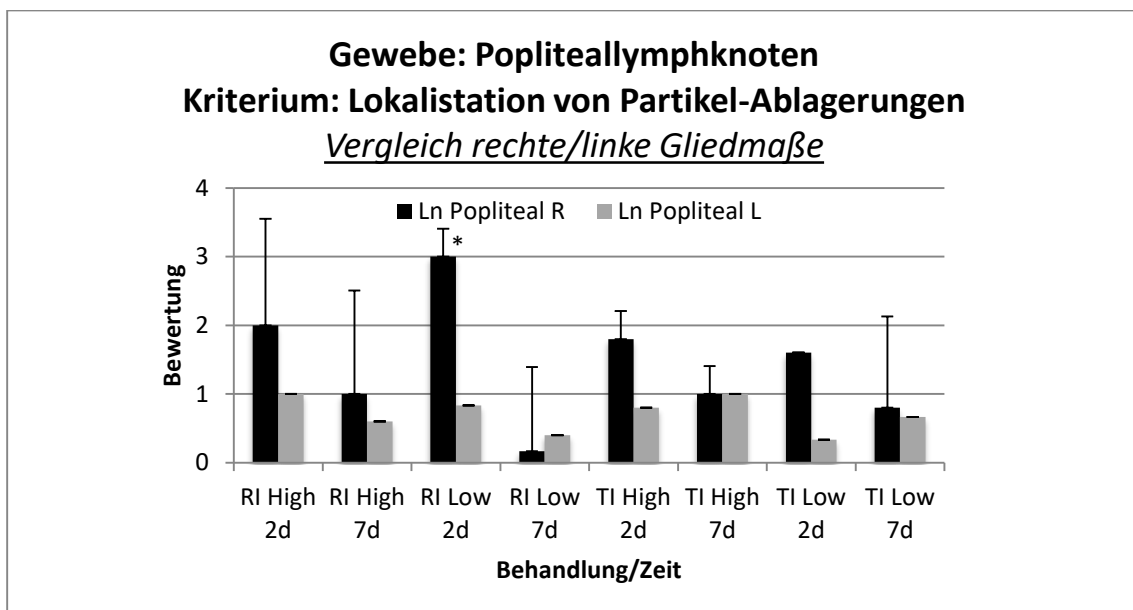


Abb. 4.8.2.3/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Lokalisation von Partikel-Ablagerungen innerhalb der Popliteallymphknoten; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Euthanasiezeitpunkten ergaben sich für die Popliteallymphknoten der rechten Hintergliedmasse signifikant höhere Werte bei den mit RI Low behandelten Tieren ($p=0,005$).

Generell ergaben sich in fast allen Gruppen höhere Werte für die rechten Popliteallymphknoten im Vergleich zu denen der linken Popliteallymphknoten innerhalb der Versuchsgruppen. Lediglich Gruppe RI Low 7d (linke Popliteallymphknoten ergaben höhere Werte als die der rechten Lymphknoten) sowie TI High 7d (Werte von linken und rechten Popliteallymphknoten erhielten die selbe Bewertung) waren Ausnahmen.

4.8.2.4 Popliteallymphknoten: Ortsfremde Zellen

Bewertet wurden: Fokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 1), multifokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 2) sowie multifokal konfluierend auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 3). Der Anteil von Entzündungszellen war in den Kniekehllymphknoten beider Seiten ähnlich gering.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen für das Kriterium „Ortsfremde Zellen“ innerhalb der Popliteallymphknoten lag zwischen 0 und .3.

Mittelwerte:

Popliteallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für „Ortsfremde Zellen“ innerhalb der Popliteallymphknoten lagen zwischen minimal 0 (RI High 2d, RI High 7d, RI Low 2d, RI Low 7d, TI High 2d sowie TI Low 7d) und maximal 0,200 (TI Low 2d).

Popliteallymphknoten Links: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0 (RI High 7d, RI Low 2d, RI Low 7d, TI High 7d sowie TI Low 2d) und maximal 0,200 (TI High 2d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich weder für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Popliteallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum statistisch signifikante Unterschiede.

4.8.2.5 Popliteallymphknoten: Struktur

Bewertungskriterien waren: Aktivierte Sekundärfollikel sowie vaskuläre Läsionen des Kortex wie Dilatationen von Blut- und/oder Lymphgefäßen (Bewertungsgrad 1), lokale sekundäre Follikelaktivierung, lokale follikuläre Depletion, lokale lymphatische Sinusektasien sowie lokale vaskuläre und medulläre Läsionen von Medulla und Kortex

wie Dilatationen von Blut- und/oder Lymphgefäßen oder lokale Makrophagen-Hyperplasien (Bewertungsgrad 2) sowie, bezogen auf das Gewebe des gesamten Organs (Cortex, Paracortex, Medulla) eine sekundäre Follikelaktivierung, follikuläre Depletion, lymphatische Sinusektasien, vaskuläre und medulläre Läsionen von Medulla und Kortex wie Dilatationen von Blut- und/oder Lymphgefäßen sowie Makrophagen-Hyperplasien (Bewertungsgrad 3). Die Struktur der Kniekehllymphknoten war 2 Tage nach der Gelenkinjektion der Partikel eher stärker verändert als 7 Tage nach der Injektion; die Struktur der linken Kniekehllymphknoten war häufiger verändert als die der rechten Seite.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelwerte lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Popliteallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (RI Low 2d sowie RI Low 7d) und maximal 1,000 (TI High 2d).

Popliteallymphknoten Links: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,167 (TI Low 2d) und maximal 1,000 (TI Low 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Popliteallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen einen signifikant höheren Mittelwert für die rechten im Vergleich zu den linken Popliteallymphknoten in der Behandlungsgruppe TI High 2d ($p=0,046$).

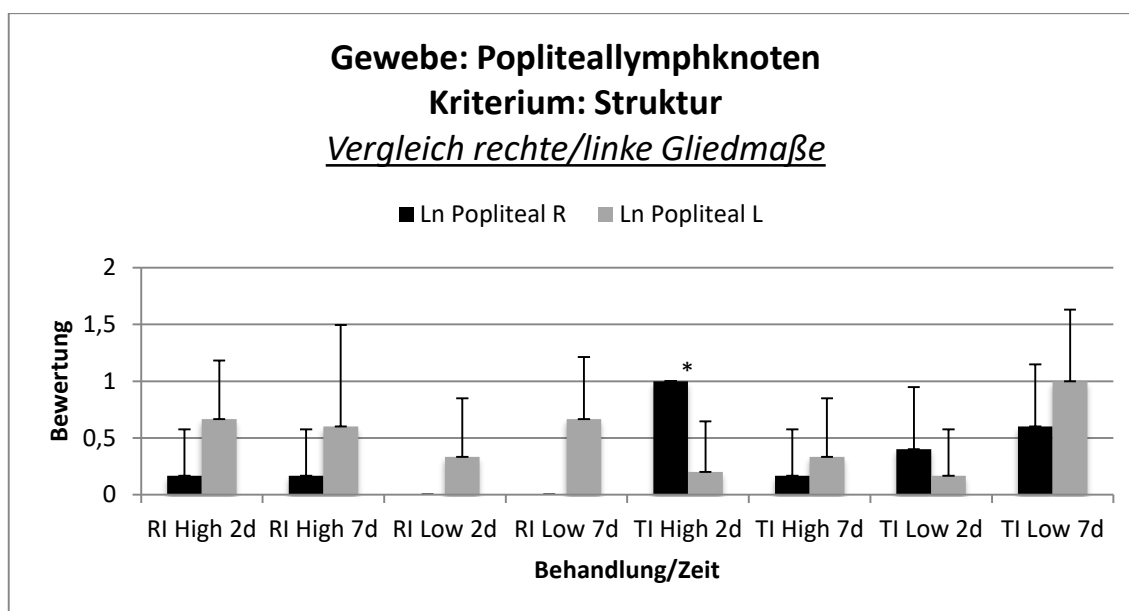


Abb. 4.8.2.5/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: histologische Struktur der Popliteallymphknoten; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergaben sich für die Popliteallymphknoten der rechten Hintergliedmasse signifikant höhere Werte nach 2 als nach 7 Tagen für die Behandlung mit TI High ($p=0,008$). Für die Popliteallymphknoten der linken Hintergliedmassen in der Behandlungsgruppe TI Low ergab sich, umgekehrt, ein signifikant höherer Wert nach 7 Tagen verglichen mit dem Wert nach 2 Tagen ($p=0,026$).

Generell zeigten die linken Popliteallymphknoten aller untersuchten Gruppen, mit Ausnahme der Gruppe TI High 2d sowie der Gruppe TI Low 2d, höhere Bewertungen als die rechten.

Innerhalb der Gruppen RI Low 2d sowie RI Low 7d konnten keine pathologischen Befunde an den rechten Popliteallymphknoten erhoben werden.

Die Bewertungen der rechten Popliteallymphknoten der Referenzgruppen zeigten im Schnitt niedrigere Scores als die rechten Popliteallymphknoten der Testgruppen.

4.8.3 Inguinallymphknoten

Bei der Beurteilung der histologischen Strukturen der Inguinallymphknoten wurde ein speziell für die Fragestellung dieser Studie angefertigtes Bewertungsschema zugrunde gelegt (siehe Abb. 3.9.1/1: Bewertungstabelle der Weichteilgewebe)

4.8.3.1 Inguinallymphknoten: Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln

Die Anzahl von Zellen in den Inguinallymphknoten wurden wie folgt bewertet: 1 bis 5 Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 1), 6 bis 10 Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 2) sowie mehr als 10 Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 3). In den Leistenlymphknoten der Seite der Injektionen waren regelmässig mehr Zellen mit phagozytierten Partikeln nachzuweisen; am Tag 2 wurden mehr dieser Zellen als am Tag 7 gefunden.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen lagen zwischen 0 (unverändert) und 3 (über 10 Zellen mit intrazellulären Partikeln).

Mittelwerte:

Inguinallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,333 (RI Low 7d) und maximal 1,833 (TI High 2d).

Inguinallymphknoten Links: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,400 (RI Low 7d) und maximal 1,000 (TI High 2d sowie TI High 7d).

Statistische Signifikanzen

In der Behandlungsgruppe RI Low 2d waren die Werte der Gewebe der rechten Inguinallymphknoten signifikant höher ($p=0,038$), als die der linken Inguinallymphknoten.

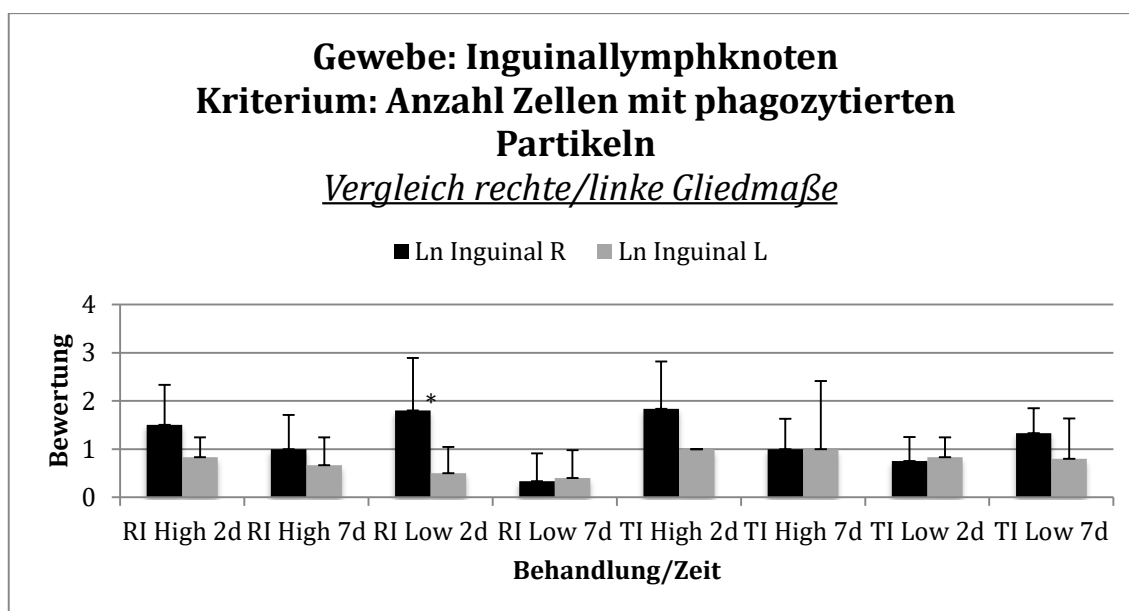


Abb. 4.8.3.1/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Anzahl Zellen mit phagozytierten Partikeln innerhalb der Inguinallymphknoten; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergaben sich für die Inguinallymphknoten keine signifikanten Unterschiede.

Generell erhielten die rechten Inguinallymphknoten der untersuchten Behandlungsgruppen (Ausnahme: Gruppe RI Low 7d und TI Low 2d) im Vergleich zu den linken Inguinallymphknoten höhere Bewertungen.

Mit Ausnahme der Gruppen, welche die Testsubstanz in niedriger Dosierung injiziert bekamen, waren nach 7 Tagen deutlich weniger Zellen mit phagozytierten Partikeln zu sehen als nach 2 Tagen.

4.8.3.2 Inguinallymphknoten: Anzahl von freien Partikeln

Die Bewertungskriterien waren: Vereinzelt auftretende extrazelluläre Partikel (Bewertungsgrad 1), unregelmässig verstreute extrazelluläre Partikel (Bewertungsgrad 2) sowie lokale Anhäufungen von extrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 3). Die Anzahl der freien Partikel war in den Leistenlymphknoten der rechten Seite sehr gering, während sie auf der linken Seite meist fehlten.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen für die Anzahl von freien Partikeln innerhalb der Inguinallymphknoten lag zwischen minimal 0 (unverändert) und maximal 3 (lokale Anhäufungen von extrazellulären Partikeln).

Mittelwerte:

Inguinallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0 (RI Low 2d, RI Low 7d, sowie TI Low 2d) und maximal 0,333 (RI High 2d und TI High 7d).

Inguinallymphknoten Links: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen für alle Behandlungsgruppen bei 0.

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich weder für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Inguinallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum statistisch signifikante Unterschiede.

4.8.3.3 Inguinallymphknoten: Lokalisation von Partikelablagerungen

Als Bewertungskriterien wurden verwendet: An Makrophagen gebundene Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 1), freie, also nicht-zellgebundene Ablagerungen von Partikeln (Bewertungsgrad 2) sowie freie und an Makrophagen gebundene Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 3). An Makrophagen gebundene oder freie Partikel waren in den rechten Leistenlymphknoten leicht vermehrt gegenüber der linken Seite.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen für „Lokalisation von Partikelablagerungen“ innerhalb der Inguinallymphknoten lag zwischen minimal 0 und 3.

Mittelwerte:

Inguinallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation lagen zwischen minimal 0,333 (RI Low 7d) und maximal 1,667 (RI High 2d).

Inguinallymphknoten Links: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation lagen zwischen minimal 0,400 (RI Low 7d) und maximal 1,000 (TI High 2d sowie TI Low 7d).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Inguinallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich bei den rechten Inguinallymphknoten für die Behandlung mit RI Low ein signifikant höherer Wert für die 2-Tages-Gruppe als für die 7-Tages-Gruppe ($p=0,049$).

4.8.3.4 Inguinallymphknoten: Ortsfremde Zellen

Bewertungskriterien für „Ortsfremde Zellen“ innerhalb der histologisch beurteilten Strukturen der Inguinallymphknoten waren fokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 1), multifokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 2) sowie multifokal konfluierend auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 3). Die Anzahl der in den Leistenlymphknoten nachgewiesenen Entzündungszellen war allgemein sehr gering aber auf der rechten Seite der Injektion mit CoCr höher als mit Si₃N₄. Auf der unbehandelten linken Seite konnten keine Entzündungszellen im Leistenlymphknoten nachgewiesen werden.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen lagen zwischen Score 0 und 3.

Mittelwerte

Inguinallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0 (RI Low 2d, RI Low 7d, TI High 2d, sowie TI Low 2d) und maximal 0,833 (RI High 2d).

Inguinallymphknoten Links: Die Mittelwerte dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0,000 (alle Behandlungsgruppen bis auf TI Low 7d) und maximal 0,200 (TI Low 7d).

Statistische Signifikanzen

Für das Kriterium „ortsfremde Zellen“ ergaben sich für den Vergleich zwischen rechten und linken Inguinallymphknoten in der Behandlungsgruppe RI High 2d deutlich höhere Werte für die rechten als für die linken Inguinallymphknoten ($p=0,025$).

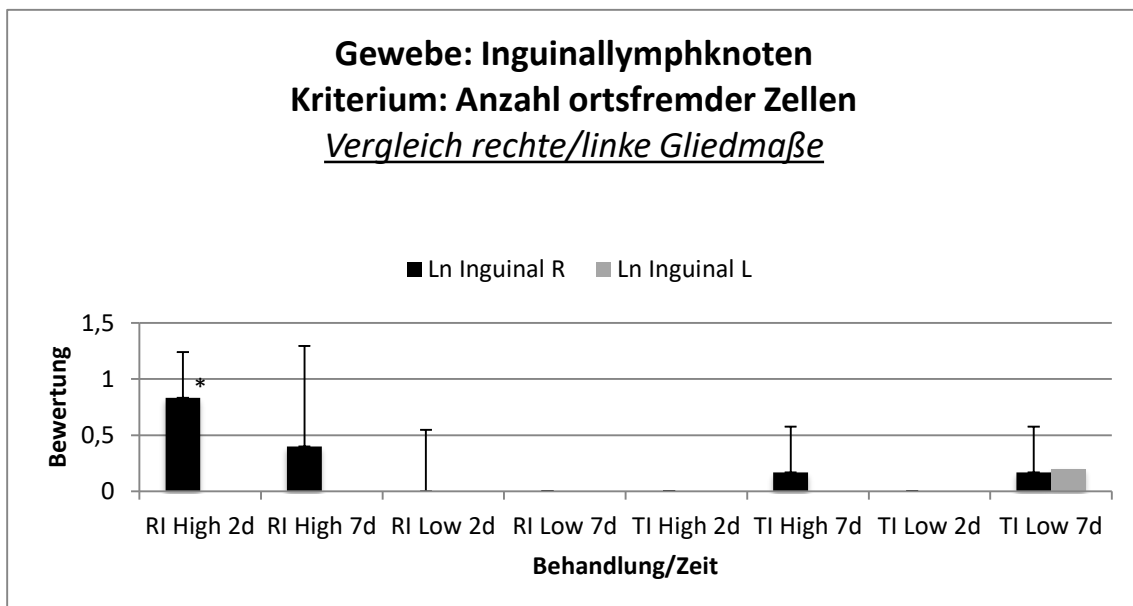


Abb. 4.8.3.4/1: Vergleich rechte/linke Hintergliedmasse, Kriterium: Anzahl ortsfremder Zellen innerhalb der Inguinallymphknoten; * entspricht $p \leq 0,05$

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für dieses Bewertungskriterium keine statistische Signifikanz.

Generell fanden sich innerhalb der Behandlungsgruppen RI Low 2d, RI Low 7d, TI High 2d sowie TI Low 2d in keinem der Inguinallymphknoten ortsfremde Zellen.

Mit Ausnahme der Gruppe TI Low 7d fanden sich in keiner untersuchten Gruppe ortsfremde Zellen innerhalb der linken Inguinallymphknoten.

4.8.3.5 Inguinallymphknoten: Struktur

Mögliche histopathologische Auffälligkeiten, welche auftreten konnten und für den Grad der Bewertung der histologischen Struktur der Inguinallymphknoten bedeutsam waren, waren aktivierte Sekundärfollikel sowie vaskuläre Läsionen des Kortex wie Dilatationen von Blut- und/oder Lymphgefäßen (Bewertungsgrad 1), lokale sekundäre Follikelaktivierung, lokale follikuläre Depletion, lokale lymphatische Sinusektasien sowie lokale vaskuläre und medulläre Läsionen von Medulla und Kortex wie Dilatationen von Blut- und/oder Lymphgefäßen oder lokale Makrophagen-Hyperplasien (Bewertungsgrad 2) sowie, bezogen auf das Gewebe des gesamten Organs (Cortex, Paracortex, Medulla), eine sekundäre Follikelaktivierung, follikuläre Depletion, lymphatische Sinusektasien, vaskuläre und medulläre Läsionen von Medulla und Kortex wie Dilatationen von Blut- und/oder Lymphgefäßen sowie Makrophagen-Hyperplasien (Bewertungsgrad 3). Die Struktur der Leistenlymphknoten zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen der linken und der rechten Seite.

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen lagen zwischen 0 und 3.

Mittelwerte:

Inguinallymphknoten Rechts: Die Mittelwerte für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen zwischen minimal 0 (RI Low 7d sowie TI Low 2d) und maximal 1,333 (RI High 2d).

Inguinallymphknoten Links: Die Mittelwerte lagen zwischen minimal 0 (TI High 2d, TI High 7d, TI Low 2d sowie TI Low 7d) und maximal 1,000 (RI High 2d sowie RI High 7d)).

Statistischer Vergleich

Für dieses Untersuchungskriterium ergaben sich weder für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Inguinallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum statistisch signifikante Unterschiede.

4.8.4 Nieren

Bei der Beurteilung der histologischen Strukturen der Nieren wurde eine speziell für die Fragestellung dieser Studie angefertigtes Bewertungsschema zugrunde gelegt (siehe Abb. 3.9.1/1: Bewertungstabelle der Weichteilgewebe, Abschnitt Bewertungstabelle Nieren). In den Nieren beider Seiten wurden allgemein keine phagozytierten und keine freien Partikel, keine Entzündungszellen und keine Strukturveränderungen nachgewiesen.

4.8.4.1 Nieren: Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln

Bewertungskriterien waren: 1 bis 5 Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 1), 6 bis 10 Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 2) sowie mehr als 10 Zellen mit intrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 3).

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Einzelbewertungen lagen alle bei Bewertungsgrad 0.

4.8.4.2 Nieren: Anzahl von freien Partikeln

Bewertungsmöglichkeiten waren: Vereinzelt auftretende extrazelluläre Partikel (Bewertungsgrad 1), unregelmässig verstreute extrazelluläre Partikel (Bewertungsgrad 2) sowie lokale Anhäufungen von extrazellulären Partikeln (Bewertungsgrad 3).

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen:

Alle Bewertung der Anzahl von freien, d.h. nicht zellgebundenen Partikeln innerhalb der Nieren lagen bei Bewertungsgrad 0.

4.8.4.3 Nieren: Lokalisation von Partikelablagerungen

Als Bewertungsmöglichkeiten standen zur Verfügung: An Makrophagen gebundenen Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 1), freie, also ungebundene Ablagerungen von Partikeln (Bewertungsgrad 2) sowie freie und an Makrophagen gebundene Partikelablagerungen (Bewertungsgrad 3).

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Alle Bewertungen der Lokalisation von Partikelablagerungen innerhalb der Nieren lagen bei Bewertungsgrad 0.

4.8.4.4 Niere: Ortsfremde Zellen

Bewertungskriterien waren: fokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 1), multifokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 2) sowie multifokal konfluierend auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 3).

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Alle Bewertungen des Kriteriums „Ortsfremde Zellen“ innerhalb der Nieren lagen bei Bewertungsgrad 0.

4.8.4.5 Nieren: Struktur

Bewertungskriterien waren: Vereinzelt auftretende proteinhaltige Flüssigkeit innerhalb der proximalen Nierentubuli (Bewertungsgrad 1), generalisiert auftretende proteinhaltige Flüssigkeit innerhalb der proximalen Nierentubuli sowie interstitielle Nephritis und geschwollene mesangiale Zellen (Bewertungsgrad 2) sowie Nekrose, Tubulonephrose, atrophische Glomeruli, tubuläre Zysten sowie papilläre Nekrose bzw. Fibrose (Bewertungsgrad 3).

Maximale und minimale Einzel-Bewertungen

Die Skala für die Bewertung des Kriteriums „Struktur“ innerhalb der Nieren lag zwischen minimal 0 (unverändert) und maximal 3 (Nekrose, Tubulonephrose, atrophische Glomeruli, tubuläre Zysten sowie papilläre Nekrose bzw. Fibrose).

Niere Rechts: Die Mittelwerte der Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen für alle Behandlungsgruppen bei 0 mit Ausnahme der Behandlungsgruppe RI Low 7d, bei welcher der Mittelwert bei 1,000 lag.

Niere Links: Die Mittelwerte der statistischen Auswertung für diese Gewebelokalisation und dieses Bewertungskriterium lagen für alle Behandlungsgruppen bei 0,000.

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich weder für den Vergleich zwischen rechter und linker Niere innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch für den Vergleich zwischen den Behandlungen der rechten bzw. linken Niere zwischen jeweils zweitägigem bzw. siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum signifikante Unterschiede.

4.8.5 Leber

Bei der Beurteilung der histologischen Strukturen der Leber wurde eine speziell für die Fragestellung dieser Studie angefertigtes Bewertungsschema zugrunde gelegt (siehe Abb. 3.9.1/1: Bewertungstabelle der Weichteilgewebe, Abschnitt Bewertungstabelle Leber).

Da die Leber ein unpaariges Organ darstellt, wurde bei der Beurteilung der histologischen Strukturen der Leber kein Vergleich zwischen rechter und linker Seite durchgeführt. Die Ergebnisse der histopathologischen Bewertungen der 2-Tages-Gruppe wurden mit denen der 7-Tages-Gruppe verglichen, um den zeitlichen Verlauf der Veränderungen zu beurteilen.

Generell konnten innerhalb der histologischen Strukturen der Lebern aller 48 untersuchten Tiere bei keiner Behandlungsgruppe und für keinen der postoperativen Überlebenszeiträume Partikel nachgewiesen werden. Somit ergab sich für die Kriterien „Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln“, „Anzahl von freien Partikeln“ sowie „Lokalisation von Partikelablagerungen“ bei allen 48 Tieren immer der Bewertungsgrad „0“.

Für das Kriterium „Ortsfremde Zellen“ ergaben sich für alle 48 untersuchten Tiere für die verschiedenen Behandlungsgruppen und postoperativen Überlebenszeiträume Bewertungsgrade zwischen „0“ und maximal „1“ (fokal/einzeln auftretende Entzündungszellen).

Für das Kriterium „Struktur“ ergaben sich für alle 48 untersuchten Tiere für die verschiedenen Behandlungsgruppen und postoperativen Überlebenszeiträume Bewertungsgrade zwischen „0“ und maximal „2“ (milde bis moderate fettige Infiltration um Zentralvenen und im Portalbereich, Sinusoid Dilatation). In der Leber konnten allgemein keine Partikel nachgewiesen werden. Die Struktur zeigte unabhängig von den Gruppen eine leichte periportale Infiltration mit Fettzellen.

4.8.5.1 Leber: Ortsfremde Zellen

Bewertungskriterien für „Ortsfremde Zellen“ waren fokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 1), multifokal auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 2) sowie multifokal konfluierend auftretende ortsfremde Zellen bzw. Entzündungszellen (Bewertungsgrad 3).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich für den Vergleich der Lebern der Tiere zwischen zweitägigem bzw. siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum innerhalb der jeweiligen Behandlungen für die Behandlung mit TI Low ($p=0,027$) statistisch signifikant höhere Werte für die 7-Tages-Gruppe.

4.8.5.2 Leber: Struktur

Bewertungskriterien waren: Milde, lokale fettige Infiltration im Bereich der Zentralvenen (Bewertungsgrad 1), eine milde bis moderate fettige Infiltration im Bereich der Zentralvenen und im Portalbereich und eine Sinusoiddilatation (Bewertungsgrad 2) sowie eine deutliche fettige Infiltration im Bereich der Zentralvenen und im Portalbereich und Nekrosen im Sinne einer hepatozellulären Dissoziation (Bewertungsgrad 3).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich für den Vergleich der Lebern der Tiere zwischen zweitägigem bzw. siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum innerhalb der jeweiligen Behandlungen keine signifikanten Unterschiede.

4.8.6 Milz

Bei der Beurteilung der histologischen Strukturen der Milz wurde eine speziell für die Fragestellung dieser Studie angefertigtes Bewertungsschema zugrunde gelegt (siehe Abb. 3.9.1/1: Bewertungstabelle der Weichteilgewebe, Abschnitt Bewertungstabelle Milz).

Da die Milz ein unpaariges Organ darstellt, wurde bei der Beurteilung der histologischen Strukturen diese Organs kein Vergleich zwischen rechter und linker Seite durchgeführt.

Somit erstreckt sich die Beurteilung der histologischen Strukturen der Milz in dieser Studie auf die Evaluierung möglicher histopathologischer Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen postoperativen Überlebenszeiträume.

Generell konnten innerhalb der histologischen Strukturen der Milzen aller 48 untersuchten Tiere bei keiner Behandlungsgruppe und für keinen der postoperativen Überlebenszeiträume Partikel nachgewiesen werden. Somit ergab sich für die Kriterien „Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln“, „Anzahl von freien Partikeln“ sowie „Lokalisation von Partikelablagerungen“ bei allen 48 Tieren immer der Bewertungsgrad „0“.

Auch für das Kriterium „Ortsfremde Zellen“ ergab sich für alle 48 untersuchten Tiere für die verschiedenen Behandlungsgruppen und postoperativen Überlebenszeiträume der Bewertungsgrad „0“.

Für das Kriterium „Struktur“ ergaben sich für alle 48 untersuchten Tiere für die verschiedenen Behandlungsgruppen und postoperativen Überlebenszeiträume Bewertungsgrade zwischen „0“ und maximal „1“ (aktivierte Follikel, erhöhte Hämosiderosis).

4.8.6.1 Milz: Struktur

Bewertungskriterien waren: Aktivierte Follikel sowie eine erhöhte Hämosiderosis (Bewertungsgrad 1), vermehrte rote und weisse Pulpa (Bewertungsgrad 2) sowie das Auftreten von Granulozyten innerhalb der roten Pulpa, Nekrose sowie Fibrose (Bewertungsgrad 3).

Statistische Signifikanzen

Für dieses Untersuchungskriterium ergab sich für den Vergleich der Milzen der Tiere zwischen zweitägigem bzw. siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum innerhalb der jeweiligen Behandlungen keine statistische Signifikanz.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- *Welche histologischen Gewebereaktionen erzeugt die intraartikuläre Injektion von Si_3N_4 -Nanopartikeln in das Kniegelenk von Ratten und welche Rückschlüsse auf die Biokompatibilität von Siliziumnitrid können daraus gezogen werden?*
- *Was sind die möglichen Verteilungs- und Ausscheidungswege von Si_3N_4 -Nanopartikeln, wenn diese intraartikulär injiziert werden?*
- *Zeigen sich Anhaltspunkte für eine mögliche Resorbierbarkeit von Si_3N_4 -Nanopartikeln in vivo?*

5.1 Tiermodell und Versuchsaufbau

5.1.1 Versuchsaufbau

Für die vorliegende Arbeit wurden 48 männliche Wistar-Ratten mit einem Durchschnittsalter von 11 Wochen verwendet.

Die Hälfte der eingesetzten Tiere wurde mit der zu testenden Substanz (Siliziumnitrid) behandelt, die andere Hälfte bekam die Referenzsubstanz (Kobalt-Chrom) verabreicht.

Diese beiden Gruppen wurden wiederum jeweils in vier Untergruppen zu jeweils sechs Tieren unterteilt, welche sich in der Art der verabreichten Substanz, deren jeweiliger Dosierung sowie des postoperativen Überlebenszeitraumes unterschieden.

Die entsprechende Substanz wurde ausschliesslich in das rechte Kniegelenk des jeweiligen Tieres appliziert, das linke Knie eines jeden Tieres blieb unbehandelt und diente als Negativkontrolle.

5.1.2 Tiermodell

Der Grund für den Einsatz von Versuchstieren in der vorliegenden Studie ergibt sich aus den genannten Fragestellungen zu möglichen Verteilungs- und Ausscheidungswegen der eingesetzten Substanzen, einer möglichen systemischen

Auswirkung dieser Substanzen, deren Resorbierbarkeit sowie der Biokompatibilität innerhalb eines lebenden Organismus, was den Einsatz von lebenden Tieren in diesem Fall zwingend notwendig machte⁶¹.

Der Einsatz der Ratte als Versuchstier kann einerseits begründet werden durch ihre Grösse, welche die intraartikuläre Injektion sowie Rückgewinnung einer ausreichenden Menge von Substanzen in und aus dem Kniegelenk erlaubt und somit den Einsatz von grösseren und höher entwickelten Säugetierspezies unnötig macht. Ausserdem ist die Ratte als Versuchstier in vergleichbaren Studien ein anerkanntes Versuchsmodell⁵²⁻⁵⁷. Die Wistar-Ratte ist besonders gut geeignet, da junge, adulte Wistar-Rattenstämme praktisch frei von degenerativen Knorpeldefekten und pathologischen Veränderungen sind und sich daher sehr gut für Forschungen in diesem Bereich eignen^{52,58,62-66}.

Die Ergebnisse der klinischen Eingangsuntersuchung, der präoperativen klinischen Untersuchung sowie der Beobachtungen der Tiere während der Akklimatisations- und der postoperativen Phase in der vorliegenden Studie ergaben keinerlei Hinweise auf orthopädische Vorerkrankungen und konnten somit die Erkenntnisse dieser vorhergehenden Studien bestätigen.

5.2 Klinischer Eingriff/ Operation

Sowohl die präoperativen Massnahmen als auch die Injektion der Substanzen in den intraartikulären Raum verliefen komplikationslos und erfolgreich.

Dies war zum einen während des chirurgischen Eingriffes erkennbar, da die Injektion der Substanzen in die Gelenkhöhle ohne merklichen Widerstand gelang, sowie zu keiner Zeit nach der Injektion und dem Zurückziehen der Kanüle aus dem Gewebe Flüssigkeit aus der Injektionsstelle austrat.

Zum anderen war zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Eröffnung des jeweiligen Kniegelenks häufig eine gräuliche Färbung der Gelenksflüssigkeit sowie teilweise Auflagerungen in der selben Farbe auf den Innenflächen der Synovialmembranen bei den Tieren erkennbar, welche die Referenzsubstanz (CoCr) injiziert bekamen, was zeigt, dass die Substanz erfolgreich in den vorgegebene Lokalisation appliziert werden konnte.

Bei den Tieren, denen die Testsubstanz verabreicht wurde, waren solche Verfärbungen und Ablagerungen nicht sichtbar, da die Testsubstanz von einer hellen, durchscheinenden Färbung war, die Referenzsubstanz jedoch von dunkelgrauer bis

bräunlicher Farbe und somit auf dem hellen Gewebe der Gelenksauskleidung deutlich sichtbar, die Testsubstanz jedoch nicht. Andererseits können hierfür auch Resorptions- und/oder Verteilungsvorgänge in das umliegende Gewebe ursächlich gewesen sein. Diese Frage wird in einer weiteren Studie mit speziellen Isolationsmethoden der Siliziumnitrid Partikel aus dem Gewebe an Ratten geklärt werden.

In der postoperativen Phase waren bei keinem Tier Anzeichen von Entzündungsreaktionen oder von systemischen Erkrankungen feststellbar. Dies spricht einerseits für die Sterilität der chirurgischen Eingriffe und andererseits dafür, dass die Gelenkstrukturen durch die Injektion keinen klinisch relevanten Schaden erfuhren und somit die Ergebnisse der nachfolgenden histologischen Untersuchungen nicht durch etwaige bakterielle Infektionen oder Defekte der Gelenkstrukturen wie z.B. der artikulierenden Gelenkknorpel oder der Synovialmembranen falsch positiv beeinflusst wurden.

5.3 Probenentnahme und Probenaufbereitung

Generell verlief die Probenentnahme und anschliessende Probenaufbereitung komplikationslos und erfolgreich. Allerdings konnten mehrere Inguinal- sowie Popliteallymphknoten aufgrund ihrer geringen Gesamtgrösse von teilweise unter einem Millimeter Durchmesser nicht in ausreichender Menge für eine aussagekräftige histologische Untersuchung aufbereitet werden. Insgesamt waren hiervon die Lymphknoten weniger Tiere betroffen und diese Tiere verteilten sich jeweils relativ gleichmässig auf die verschiedenen Behandlungsgruppen, wodurch die Auswertbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Behandlungsgruppen nicht nennenswert beeinflusst wurde. Bei der Probenentnahme der Lymphknoten konnte festgestellt werden, dass von den insgesamt 48 Inguinallymphknoten der jeweils rechten, also behandelten Hintergliedmasse, sechs makroskopisch vergrössert erschienen. Ein rechter Inguinallymphknoten erschien hämorrhagisch inhibiert. Von den rechten Popliteallymphknoten erschien einer makroskopisch vergrössert. Keiner der insgesamt 48 linken Inguinal- sowie 48 linken Popliteallymphknoten erschien makroskopisch verändert.

Dies legt den Schluss nahe, dass es im Bereich der behandelten, rechten Kniegelenksstrukturen teilweise zu immunologischen Reaktionen kam mit daraus resultierender Aktivierung und Vergrösserung der genannten Lymphknoten.

Ob diese immunologischen Reaktionen allerdings durch die Injektionen und die zwangsläufigen Gewebeverletzungen im Bereich des Stichkanals herrührten oder Folge einer Reaktion auf die injizierten Substanzen war, kann in diesem Zusammenhang und in Hinblick darauf, dass die Tiere, welche vergrößerte Lymphknoten aufwiesen, aus verschiedenen Behandlungsgruppen stammten und sowohl die Test- als auch die Referenzsubstanz in verschiedenen Dosierungen injiziert bekamen, nicht zweifelsfrei unterschieden werden.

In diesem Zusammenhang könnte diskutiert werden, ob eine Injektion eines Placebo-Wirkstoffes (wie beispielsweise steriles PBS) in das jeweils linke Kniegelenk eines jeden Tieres sinnvoll gewesen wäre, um auch dort eine vergleichbare Läsion des Gewebes zu schaffen. Dadurch hätte eventuell genauer differenziert werden können, ob die lymphatischen Veränderungen im Kniegelenksbereich durch den chirurgischen Eingriff oder durch die entsprechende Substanz hervorgerufen wurden.

Allerdings hätte diese Methode zeitgleiche invasive Eingriffe an beiden Gliedmassen benötigt, was eine deutliche Mehrbelastung der Tiere bedeutet hätte. Des Weiteren wäre eine systemische Kreuzreaktion der eingesetzten Substanzen nicht vollständig auszuschliessen gewesen, was die Aussagekraft eventueller klinischer und histologischer Ergebnisse deutlich beeinflusst hätte. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie auf den Einsatz eines Placebo-Wirkstoffes verzichtet.

5.4 Statistische Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse

In diesem Abschnitt sollen alle statistisch signifikanten Ergebnisse der histologischen sowie immunhistochemischen Auswertung diskutiert werden.

Für die Gewebelokalisationen und deren spezifischen Bewertungskriterien wurde jeweils zum einen ein Vergleich zwischen behandelter (rechter) und unbehandelter (linker) Gliedmasse innerhalb jeder der acht Behandlungsgruppen vollzogen, um zu sehen, ob sich die Gewebereaktionen unterschieden. Zum Anderen wurde innerhalb der jeweiligen Behandlungen (Injektion von Test- bzw. Referenzsubstanz in jeweils hoher bzw. niedriger Dosierung) ein Vergleich zwischen den postoperativen Überlebensphasen von zwei- bzw. sieben Tagen durchgeführt, um einen eventuellen zeitlichen Verlauf der Gewebeveränderungen zu erkennen.

Für die Evaluierung des Knorpels wurde ein modifizierter Mankin-Score angewendet, für die der Weichteilgewebe eine speziell für diese Fragestellung entworfene Bewertungstabelle.

5.4.1 Kniegelenk

5.4.1.1 Kniegelenks-Knorpel

Die Kriterien für die Bewertung des Kniegelenk-Knorpels waren:

- Die zelluläre Beschaffenheit des Knorpels
- Die Beschaffenheit der Knorpel-Tidemark
- Die generelle Struktur des Knorpels

Die histologische Auswertung der Knorpelgewebe der untersuchten Tiere wurde an drei verschiedenen Lokalisationen durchgeführt. Es wurden hierbei zwei definierte Bereiche des femoralen Kniegelenkknorpels sowie ein definierter Bereich des tibialen Gelenkknorpels histologisch betrachtet, um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis des Zustandes der gesamten artikulierenden Knorpelfläche zu erhalten.

Für die histologische Evaluierung des Gelenkknorpels wurden drei verschiedene Kriterien untersucht: Die zelluläre Beschaffenheit des Knorpels („**Knorpelzellen**“), die Beschaffenheit der Knorpel-Tidemark („**Knorpel-Tidemark**“) sowie die generelle Struktur des Knorpels („**Knorpelstruktur**“) an den jeweiligen definierten Lokalisierungen.

Weder für das Kriterium „**Knorpelstruktur**“ noch für das Kriterium „**Knorpel-Tidemark**“ ergaben sich Unterschiede für den betrachtenden Vergleich zwischen rechtem und linkem Kniegelenk sowie zwischen den verschiedenen postoperativen Überlebenszeitraum.

Dies zeigt, dass weder Kobalt-Chrom noch Siliziumnitrid in dieser Studie, unabhängig von deren Konzentration oder zeitlichen Einwirkung, negative Einflüsse auf die histologische Struktur des Knorpels oder die Knorpel-Tidemark hatten.

Lediglich für das Kriterium „**Knorpelzellen**“ ergab sich für den Vergleich der verschiedenen postoperativen ÜZ (und hier lediglich für die Lokalisation „Femur 1“) und der Behandlung mit der Referenzsubstanz Kobalt-Chrom in geringer Dosierung eine statistische Signifikanz. Hierbei war der Wert für den zweitägigen Überlebenszeitraum signifikant höher als der des siebentägigen Überlebenszeitraum.

Dies lässt die Folgerung zu, dass die Behandlung mit Kobalt-Chrom den Kniegelenkknorpel geschädigt hat, der Knorpel aber nach 7 Tagen bereits wieder regeneriert war.

Die Behandlung mit der Testsubstanz Siliziumnitrid ergab keine Anzeichen negativer Einflüsse auf die histologische Beschaffenheit des Gelenkknorpels.

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass Siliziumnitrid für keines der untersuchten Kriterien Hinweise auf eine negative Beeinflussung des Kniegelenksknorpels erbrachte, was mit Ergebnissen vorhergehender Studien korreliert^{19,35}, wo hingegen Kobalt-Chrom sich negativ auf die zelluläre Zusammensetzung des Kniegelenksknorpels bei längerer zeitlicher Einwirkung auswirkte. Diese Erkenntnis deckt sich mit Ergebnissen einer Studie von Grammatopoulos et al., in welcher bei der Untersuchung von Hüft-Endoprothesen aus Kobalt-Chrom ausgeprägte perivaskuläre lymphoide Infiltrate sowie Makrophagen-Reaktionen und in allen Fällen eine Gewebsnekrose festgestellt wurden³⁸.

5.4.1.2 Partikel innerhalb der Kniegelenksstrukturen

Kriterien für die Bewertung der injizierten Partikel innerhalb der Kniegelenksstrukturen waren:

- Die Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln
- Die Anzahl von freien (extrazellulären) Partikeln
- Die Lokalisation von Partikelablagerungen

Die Lokalisation für die histologische Untersuchung dieser Kriterien umfasste die gesamte Gewebestruktur der betreffenden Kniegelenke.

Für das Untersuchungskriterium „**Zellen mit phagozytierten Partikeln**“ zeigen die Ergebnisse der statistischen Auswertungen, dass weder die Art der Injektionslösung noch die Konzentrationen dieser Lösungen eine Rolle hinsichtlich der Bewertungsgrade spielten. In keinem der unbehandelten Gelenke fanden sich Zellen mit Partikeln, wohingegen alle rechten Kniegelenke Zellen mit phagozytierten Partikeln aufwiesen, mit Ausnahme der Gruppe TI Low 2. Somit kann für dieses Kriterium geschlussfolgert werden, dass die Injektion von Partikeln in das rechte Kniegelenk keine Auswirkungen auf das jeweils korrespondierende linke Kniegelenk hatte.

Für den Vergleich zwischen dem zweitägigen und siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum war der Wert nach sieben Tagen bei Injektion von RI Low höher als nach zwei Tagen. Offensichtlich begann die Phagozytierung der (anfänglich immer) freien Partikel erst zwischen zwei und sieben Tagen.

Für das Untersuchungskriterium **„Anzahl von freien Partikeln“** zeigte die vergleichende Betrachtung zwischen behandeltem und unbehandeltem Kniegelenk der Tiere auch hier eine deutliche Auswirkung auf die Menge an nachweisbaren freien Partikeln.

So waren in den jeweils linken Kniegelenken sämtlicher Untersuchungsgruppen keine Partikel nachweisbar.

Innerhalb der Gruppen, welche die Referenzsubstanz (Kobalt-Chrom) injiziert bekamen, waren unabhängig von Konzentration und postoperativem ÜZ in den rechten Kniegelenken dagegen freie Partikel nachweisbar.

Dies lässt, wie schon bei dem Kriterium **„Zellen mit phagozytierten Partikeln“**, die Schlussfolgerung zu, dass die Injektion von Partikeln in das rechte Kniegelenk keine Auswirkungen auf das jeweils korrespondierende linke Kniegelenk hat.

Innerhalb dieser Gruppen konnte kein statistischer Unterschied der Bewertungsgrade im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Konzentration der Substanzen sowie der verschiedenen postoperativen ÜZ festgestellt werden.

Generell auffällig war, dass innerhalb der rechten Kniegelenke lediglich in einer Siliziumnitrid-Behandlungsgruppe überhaupt freie Partikel gefunden wurden (TI Low 7d), wohingegen in allen vier Kobalt-Chrom-Behandlungsgruppen freie Partikel nachgewiesen wurden.

Eine Erklärung hierfür kann zum einen sein, dass die Siliziumnitrid-Partikel aufgrund ihrer hellen, durchscheinenden Farbe in sehr geringen Konzentrationen lichtmikroskopisch schlechter zu erfassen waren als Kobalt-Chrom-Partikel. Als andere Erklärung für diese Feststellung kann ein höherer Verteilungs- und/oder Resorptionsgrad der Siliziumnitrid-Partikel im Vergleich zu den Kobalt-Chrom-Partikeln genannt werden.

Innerhalb des Untersuchungskriteriums **„Lokalisation von Partikelablagerungen“** spielte innerhalb der Behandlungsgruppen weder die eingesetzte Substanz noch deren Konzentration eine signifikante Rolle.

Für die Bewertungskriterien „Anzahl von freien Partikeln“ sowie „Lokalisation von Partikelablagerungen“ ergaben sich nur signifikante Unterschiede für die Behandlung mit RI Low, wobei jeweils der Wert für den siebentägigen ÜZ höher ausfiel als für den zweitägigen ÜZ. Weshalb die Menge an freien Partikeln nach sieben Tagen höher als nach zwei Tagen waren, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht zweifelsfrei klären.

Dass die Werte für das Kriterium „Lokalisation von Partikelablagerungen“ nach sieben Tagen höher ausfiel als nach zwei Tagen, hängt mit den histopathologischen Merkmalen zusammen, welche für den Grad der Bewertung massgeblich waren: Je mehr freie Partikel nachweisbar waren, desto höher fiel die Bewertung für das Kriterium „Lokalisation der Partikelablagerungen“ aus. Aus diesem Grund beeinflussten sich die beiden genannten Kriterien gegenseitig.

5.4.1.3 Kniegelenks-Fettkörper

Kriterien für die Bewertung Kniegelenks-Fettkörper waren:

- Die generelle strukturelle Beschaffenheit sowie die Menge an Entzündungszellen innerhalb der Fettkörper („Kniegelenks-Fettkörper“)
- Anzahl von Mastzellen innerhalb der Fettkörper

Für das Untersuchungskriterium „**Kniegelenks-Fettkörper**“ zeigte sich, dass die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen sowie die zeitliche Exposition zu diesen Substanzen keine Auswirkung auf die histologische Beschaffenheit des Fettkörpers hatten. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Siliziumnitrid als auch Kobalt-Chrom die generelle strukturelle Beschaffenheit verschlechterten sowie die Menge an Entzündungszellen innerhalb der Fettkörper erhöhten, jedoch der Kontakt der Fettkörper mit Kobalt-Chrom schwerere Läsionen der Kniegelenksfettkörper hervorrief als der Kontakt mit Siliziumnitrid, und dass die unbehandelten linken Kniegelenke nicht von den negativen Einflüssen der im korrespondierenden rechten Kniegelenk eingesetzten Substanzen betroffen waren.

Für das Untersuchungskriterium „**Anzahl Mastzellen im Fettkörper**“ ergab sich eine zeitliche Abhängigkeit für das Auftreten von Mastzellen innerhalb des Fettkörpers bei beiden Testsubstanzen, wobei sich diese im Verlauf der Zeit in der Umgebung anhäuferten, wahrscheinlich als Zeichen einer immunologischen Reaktion in Form der

Aktivierung und Rekrutierung von Mastzellen, was auch schon in vorhergehenden Studien gezeigt werden konnte^{8,38}.

5.4.1.4 Synovialmembran

Generell ergaben sich für dieses Kriterium höhere Werte für die jeweils rechten im Vergleich zu den korrespondierenden linken Synovialmembranen, unabhängig von postoperativem ÜZ, Art und Konzentration der eingesetzten Substanzen. Ob entweder beide Substanzen negative Auswirkungen auf die histologische Struktur der Synovialmembranen hatten oder die mechanische Einwirkung der Injektionen der Substanzen diese negativen Gewebereaktionen auslösten, kann nicht endgültig entschieden werden. Da die Gelenkinjektion insgesamt aber ein kleines Trauma darstellt, und keine klinischen und histologischen Hinweise auf eine mechanische Schädigung der Gelenkstrukturen durch die Injektion vorlagen, scheint es wahrscheinlicher, dass die Substanzen selber die Schäden verursacht haben..

5.4.1.5 Immunhistochemische Untersuchung (Expression von COX-2- und iNOS-Antikörperreaktionen)

Die Kriterien für die Bewertung der immunhistochemischen Untersuchungen waren:

- Die Bewertung der immunhistochemischen COX-2-Expression
- Die Bewertung der immunhistochemischen iNOS-Expression

Die histologische Untersuchung bezüglich dieser Kriterien bezog sich auf die Synovialzellen der Kniegelenke.

Für das Kriterium „**Bewertung immunhistochemische COX-2-Expression**“ konnte weder eine statistisch signifikante COX-2-Antikörperreaktion für den Vergleich zwischen rechter und linker Hintergliedmasse innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen noch für den Vergleich der Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum beobachtet werden.

Da die Cyclooxygenase-2 ein wichtiger Indikator für die Entstehung einer Entzündungsreaktion ist und innerhalb dieses Bewertungskriteriums keine statistisch signifikante Expression dieses Enzyms beobachtet werden konnte, kann

geschlussfolgert werden, dass innerhalb dieser Studie weder Siliziumnitrid noch Kobalt-Chrom (unabhängig von zeitlicher Exposition sowie Konzentration) eine erhöhte Induktion dieses Enzyms innerhalb der Synovialzellen der Kniegelenke bedingten. Somit ergibt sich in diesem Zusammenhang kein Hinweis auf die Auslösung einer Entzündungsreaktion durch diese Substanzen.

Für das Untersuchungskriterium **„Bewertung immunhistochemische iNOS-Expression“** ergab sich ein Unterschied hinsichtlich der Art der eingesetzten Substanzen. Hierbei ergaben sich höhere iNOS-Antikörperexpressionen für die Behandlungsgruppen, welche mit Siliziumnitrid behandelt wurden als für jene Gruppen, welche Kobalt-Chrom appliziert bekamen.

Auch die vergleichende Betrachtung der Synovialzellen zwischen behandelter und unbehandelter Gliedmasse ergab auffällige Unterschiede.

So waren bei allen Behandlungsgruppen (mit Ausnahme der Gruppe RI High 7d) die Ausprägung der Antikörperreaktion innerhalb der Synovialzellen der behandelten rechten Gliedmasse höher als die der unbehandelten linken Gliedmasse.

Diese Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass einerseits beide Substanzen generell die Expression von iNOS verstärken und somit eine Entzündungsreaktion induziert haben, bezüglich dieses Kriteriums jedoch Siliziumnitrid eine etwas stärkere Reaktion hervorrief als die Referenzsubstanz Kobalt-Chrom, wobei der Unterschied hierbei jedoch nicht statistisch signifikant war.

5.4.2 Popliteallymphknoten

5.4.2.1 Partikel innerhalb der Popliteallymphknoten

Die Kriterien für die Bewertung der injizierten Partikel innerhalb der Popliteallymphknoten waren:

- Die Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln
- Die Anzahl von freien (extrazellulären) Partikeln
- Die Lokalisation von Partikelablagerungen

Für das Untersuchungskriterium „**Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln**“ ergab sich für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum für den Popliteallymphknoten der rechten Hintergliedmasse eine statistische Signifikanz für die Behandlung mit RI Low sowie für die Behandlung mit TI High, wobei hier jeweils der Wert für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Dies steht im Widerspruch zu den Erkenntnissen der Untersuchungen des gleichen Kriteriums für die Kniegelenke, da dort gleichfalls eine statistische Signifikanz erkennbar war zwischen zwei- und siebentägigem ÜZ, wobei hier allerdings die Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln nach sieben Tagen postoperativ höher als nach zwei Tagen war.

Eine mögliche Erklärung hierfür kann in der Verteilung der Partikel vom Injektionsort in die Peripherie und somit den regionalen Lymphknoten gesehen werden. Durch eine mit der Zeit zunehmende Phagozytierung der Partikel an der ursprünglichen Lokalisation durch eine Zunahme an phagozytierenden Immunzellen, wurden im Verlauf der Zeit weniger Partikel in die Peripherie gestreut und somit traten insgesamt nach sieben Tagen weniger Partikel innerhalb der Popliteallymphknoten auf als kurz nach der Injektion, was auch die Anzahl der Zellen mit phagozytierten Partikel innerhalb der Popliteallymphknoten nach sieben Tagen verringerte. Diese Annahme deckt sich mit Erkenntnissen einer vorhergehenden Studie durch Revell et al., in welcher der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Abriebpartikeln und Makrophagen innerhalb von Gelenken untersucht wurde⁸.

Über das Untersuchungskriterium „**Anzahl von freien Partikeln**“ kann gesagt werden, dass nur in rechten und nicht in linken Popliteallymphknoten freie Partikel gefunden wurden. Dies zeigt, dass die Partikel zwar grundsätzlich in die Peripherie gestreut werden können, diese Streuung allerdings lokal begrenzt ist und sich nicht bis in die kontralateralen Lymphknoten erstreckt.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für den Popliteallymphknoten der rechten Hintergliedmasse eine statistische Signifikanz für die Behandlung mit RI Low, wobei hier der Wert für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Die Zeitspanne nach der Injektion hat offensichtlich eine deutliche Auswirkung auf die Menge an nachweisbaren freien Partikeln. Diese Erkenntnis deckte sich mit dem Ergebnis der Untersuchung des vorherigen Kriteriums („Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln“) und lässt sich auch durch die selbe Schlussfolgerung erklären.

Auch für das Untersuchungskriterium „**Lokalisation von Partikelablagerungen**“ zeigten sich generell in sämtlichen Gruppen deutlich höhere Werte und somit gravierendere Partikelablagerungen für die rechten Popliteallymphknoten im Vergleich zu den linken Popliteallymphknoten innerhalb der Versuchsgruppen. Signifikant fiel dieser Unterschied bei der Gruppe RI Low 2d aus.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für den Popliteallymphknoten der rechten Hintergliedmasse eine statistische Signifikanz für die Behandlung mit RI Low, wobei hier der Wert für den zweitägigen höher ausfiel als für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Weder der Vergleich zwischen den Popliteallymphknoten von behandelter bzw. unbehandelter Gliedmasse noch die Zeitdauer zwischen der postoperativen ÜZ hatte eine signifikante Auswirkung auf die Menge an nachweisbaren freien Partikeln.

Diese Erkenntnisse decken sich wiederum mit denen der zwei vorhergehenden Kriterien zur Untersuchung der Verteilung der injizierten Partikel und deren Gewebereaktionen.

5.4.2.2 Histologische Untersuchung der Struktur der Popliteallymphknoten

Für das Untersuchungskriterium „Struktur“ zeigte sich für den Vergleich zwischen rechten und linken Popliteallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen generell, dass im allgemeinen die linken Popliteallymphknoten geringere strukturelle histopathologische Läsionen aufwiesen als die rechten, bei welchen die Läsionen im Vergleich schwerer ausfielen. Nur für die Behandlungsgruppe TI High 2d ergab sich allerdings hierbei ein statistisch signifikanter Unterschied.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergaben sich für die Popliteallymphknoten der rechten Hintergliedmasse statistische Signifikanzen für die Behandlung mit TI High, wobei hier der Wert für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum. Für die Popliteallymphknoten der linken Hintergliedmasse ergab sich eine Signifikanz für die Behandlung mit TI Low, wobei hier der Wert für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum. Weder die Art noch die Konzentration der Substanzen oder der postoperative ÜZ scheint eine konsistente Einwirkung auf die histologischen Strukturen der Popliteallymphknoten zu haben.

5.4.3 Inguinallymphknoten

5.4.3.1 Partikel innerhalb der Inguinallymphknoten

Die Kriterien für die Bewertung der injizierten Partikel innerhalb der Inguinallymphknoten waren:

- Die Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln
- Die Anzahl von freien (extrazellulären) Partikeln
- Die Lokalisation von Partikelablagerungen

Innerhalb des Untersuchungskriteriums „**Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln**“ fanden sich in den rechten Inguinallymphknoten der untersuchten Behandlungsgruppen mit Ausnahme der Gruppen RI Low 7d und TI Low 2d im Vergleich zu den linken Inguinallymphknoten generell mehr Zellen mit phagozytierten Partikeln. Für die Behandlungsgruppe RI Low 2d war dieser Unterschied statistisch

signifikant. Mit Ausnahme der Tiere, denen die Testsubstanz in niedriger Dosierung injiziert wurde (Ti Low 2d), waren innerhalb des siebentägigen postoperativen ÜZ durchweg weniger Zellen mit phagozytierten Partikeln zu finden als für den zweitägigen postoperativen ÜZ.

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass innerhalb dieses Kriteriums weder die Art noch die Konzentration der eingesetzten Substanzen eine signifikante Auswirkung auf die Anzahl von phagozytierten Zellen innerhalb der Inguinallymphknoten hatte. Lediglich in der vergleichenden Betrachtung zwischen den Lymphknoten der behandelten bzw. unbehandelten Gliedmasse waren erwähnenswerte Unterschiede festzustellen, (wobei hier die rechten Lymphknoten generell eine höhere Anzahl an Zellen mit phagozytierten Partikeln aufwiesen), was mit der Lokalisation der Injektion in das rechte Kniegelenk erklärt werden kann, sowie des postoperativen ÜZ. Hier war die Anzahl an Zellen mit phagozytierten Partikeln im Durchschnitt nach sieben Tagen geringer als nach zwei Tagen. Dies deckte sich mit den Erkenntnissen der Untersuchung der Popliteallymphknoten für das selbe Kriterium und kann gleichfalls damit erklärt werden, dass die Verteilung der Partikel vom Injektionsort in die Peripherie und somit in die regionalen Lymphknoten im Verlauf der Zeit abnimmt.

Für das Untersuchungskriterium „**Anzahl von freien Partikeln**“ ergaben sich weder für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Inguinallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen, noch für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum eine statistische Signifikanz. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass weder die Art der eingesetzten Substanzen noch deren Konzentration noch deren zeitliche Exposition die Anzahl an freien Partikeln innerhalb der Inguinallymphknoten in nennenswertem Ausmass beeinflussten.

Für das Untersuchungskriterium „**Lokalisation von Partikelablagerungen**“ ergab sich für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Inguinallymphknoten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen keine statistische Signifikanz.

Für den Vergleich zwischen den Behandlungen mit zweitägigem und siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum ergab sich für die Inguinallymphknoten der rechten Hintergliedmasse eine statistische Signifikanz für die Behandlung mit RI Low, wobei hier der Wert für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum, was wiederum mit der

Abnahme der Streuung der Partikel vom Injektionsort in die Peripherie und somit in die regionalen Lymphknoten im Verlauf der Zeit zu erklären ist.

5.4.3.2 Ortsfremde Zellen im Sinne von Entzündungszellen

Für die Gruppen RI Low 2d, RI Low 7d, TI High 2d sowie TI Low 2d fanden sich weder in den linken noch in den rechten Inguinallymphknoten ortsfremde Zellen.

Im linken Inguinallymphknoten waren nur in der Gruppe TI Low 7d ortsfremde Zellen erkennbar.

Für den Vergleich zwischen rechtem und linkem Inguinallymphknoten der jeweiligen Behandlungsgruppen ergab sich eine statistische Signifikanz in der Behandlungsgruppe RI High 2d, wobei sich innerhalb dieser Gruppe eine erhöhte Anzahl an ortsfremden Zellen in den rechten Inguinallymphknoten fand, innerhalb der linken Inguinallymphknoten jedoch keine ortsfremden Zellen nachgewiesen werden konnten.

Hier zeigt sich, dass die Zeitdauer und Konzentration der eingesetzten Substanzen keinen Einfluss auf die Anzahl von Entzündungszellen innerhalb der Inguinallymphknoten hatte, wo hingegen die vergleichende Betrachtung zwischen den Inguinallymphknoten von behandelter bzw. unbehandelter Gliedmasse deutliche Unterschiede in der Anzahl an Entzündungszellen ergab. Im Durchschnitt wurden deutlich höhere Mengen an ortsfremden Zellen in den rechten Inguinallymphknoten nachgewiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass entweder die Gewebeläsionen durch die Injektion der Substanzen oder aber die Substanzen selbst – unabhängig davon, ob es sich hierbei um Siliziumnitrid oder Kobalt-Chrom handelte, sowie deren jeweiliger Konzentration oder Expositionszeit auf das Gewebe – eine Entzündungsreaktion hervorriefen.

Allerdings zeigte sich, dass die Art der eingesetzten Substanz eine gewisse Rolle im Hinblick auf die Ergebnisse spielte, welche jedoch nicht statistisch relevant ausfiel. So ergaben sich für die Referenzsubstanz im Durchschnitt etwas höhere Bewertungen als für die Testsubstanz, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass innerhalb dieses Kriteriums Kobalt-Chrom eine stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion hervorruft als Siliziumnitrid.

5.4.4 Niere und Milz

Die Kriterien für die Bewertung der histologischen Strukturen von sowohl den Nieren als auch der Milz der eingesetzten Tiere umfassten:

- Die Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln
- Die Anzahl von freien (extrazellulären) Partikeln
- Die Lokalisation von Partikelablagerungen
- Die Anzahl an ortsfremden Zellen (Entzündungszellen)
- Die histologische Struktur der Organe

Für die untersuchten Nieren sowie Milzen aller in dieser Studie verwendeten Tiere ergaben sich für keines der untersuchten Kriterien signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und den Zeitpunkten der Untersuchung.

Es fanden sich bei keinem der Tiere innerhalb der genannten Organe freie, also extrazelluläre Partikel, Zellen mit phagozytierten Partikel oder Partikelablagerungen.

Weiterhin fanden sich keinerlei ortsfremde Zellen in Form von Entzündungszellen innerhalb dieser Organe.

Die Struktur beider Nieren jedes Tieres waren histologisch ohne besonderen Befund, somit ergaben sich für keine untersuchte Niere Anzeichen einer histopathologischen Läsion.

Die Struktur der Milz lag für alle Tiere zwischen Bewertungsgrad „0“ und „1“, wobei der Bewertungsgrad „1“ für dieses Gewebe und Kriterium das Auftreten von aktivierten Follikeln und eine erhöhte Hämosiderosis bedeutet. Bewertungsgrade „1“ traten hierbei für jede Behandlungsgruppe in etwa der gleichen Häufigkeit auf. Es ergaben sich hier keinerlei Anzeichen für einen Zusammenhang des Auftretens dieser histopathologischen Merkmale und der Art der verwendeten Substanzen, deren Konzentration oder Expositionszeit, also des postoperativen ÜZ.

Weder Siliziumnitrid noch Kobalt-Chrom scheinen in das Gewebe von Nieren oder Milzen der Tiere zu gelangen und demzufolge ergaben sich keine lokalen oder systemischen Auswirkungen der applizierten Substanzen auf diese Gewebe.

5.4.5 Leber

Die Kriterien für die Bewertung der histologischen Strukturen der Lebern der eingesetzten Tiere waren die selben wie für die Bewertung von Nieren und Milzen.

Es fanden sich bei keinem der Tiere innerhalb der genannten Organe freie, also extrazelluläre Partikel, Zellen mit phagozytierten Partikel oder Partikelablagerungen, woraus wie bei den untersuchten Geweben von Milz und Nieren der Schluss gezogen werden kann, dass weder Siliziumnitrid noch Kobalt-Chrom in das Gewebe der Leber der Tiere gelangten.

Innerhalb der untersuchten Lebergewebe traten vereinzelt ortsfremde Zellen im Sinne von Entzündungszellen auf. Da dieses Auftreten aber weder mit der Art noch der Konzentration oder Expositionszeit der Substanzen in Verbindung gebracht werden kann, scheint es sich um einen Zufallsbefund zu handeln.

Bei der histologischen Untersuchung der Lebern ergab sich lediglich für das Kriterium „**Ortsfremde Zellen**“ eine statistische Signifikanz für den Vergleich der Lebern der Tiere zwischen zweitägigem bzw. siebentägigem postoperativen Überlebenszeitraum innerhalb der Behandlung mit TI Low, wobei hier der Wert für den siebentägigen postoperativen Überlebenszeitraum höher ausfiel als für den zweitägigen postoperativen Überlebenszeitraum.

Da sich jedoch wie erwähnt bei keinem der Tiere innerhalb der genannten Organe freie, also extrazelluläre Partikel, Zellen mit phagozytierten Partikel oder Partikelablagerungen fanden, steht dieser Befund wahrscheinlich nicht in einem kausalen Zusammenhang mit dem Einsatz von Siliziumnitrid, sondern kann als zufällige bzw. nicht mit der Fragestellung in Zusammenhang gehörigen Auffälligkeit gewertet werden.

Zusammenfassend kann für die Gewebe der Organe Milz, Leber und Niere aller in dieser Studie untersuchter Tiere der Schluss gezogen werden, dass weder der Einsatz von Siliziumnitrid noch der Einsatz von Kobalt-Chrom innerhalb dieser Studie einen Hinweis auf eine negative Einwirkung auf diese Gewebe ergaben.

6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebereaktionen von intraartikulär injizierten Siliziumnitrid- und Kobalt-Chrom-Nanopartikeln in das Kniegelenk von Ratten sowie mögliche Verteilungs- und Ausscheidungswege dieser Partikel untersucht. Weiterhin wurde untersucht, ob sich mögliche Anhaltspunkte für eine Resorbierbarkeit von Siliziumnitrid in vivo innerhalb der vorliegenden Studie ergeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Siliziumnitrid als auch Kobalt-Chrom in geringem Ausmass Gewebereaktionen auslösten.

Dies zeigte sich in einer (zeitlich abhängigen) Aktivierung und Rekrutierung von Mastzellen innerhalb der Kniegelenksfettkörper sowie durch histopathologisch fassbare Läsionen der Gewebestruktur innerhalb der Kniegelenksfettkörper und Synovialmembranen der behandelten Kniegelenke.

Es kam jedoch weder bei der Behandlung mit Siliziumnitrid noch bei der Behandlung mit Kobalt-Chrom zu histopathologischen Auffälligkeiten in Leber, Milz und Nieren der eingesetzten Tiere.

Allerdings war der Grad an pathologischen Gewebereaktionen unter der Behandlung mit Kobalt-Chrom insgesamt stärker ausgeprägt als unter Siliziumnitrid.

Dies zeigte sich in der histologischen Betrachtung der Kniegelenksknorpel, da hier keinerlei negative Einwirkungen von Siliziumnitrid auf die untersuchten Knorpelgewebe auftraten, wohingegen die zelluläre Beschaffenheit des Kniegelenksknorpels durch eine längere Einwirkung von Kobalt-Chrom auf die betreffenden Gewebe (innerhalb der Gruppen mit siebentägigem postoperativem Überlebenszeitraum) negativ beeinflusst wurde. Zudem ergab sich eine im Vergleich zu der Behandlung mit Siliziumnitrid gesteigerte Immunantwort in Form einer Fremdkörperreaktion mit gesteigerter Anzahl von phagozytierenden Zellen innerhalb der mit Kobalt-Chrom behandelten Versuchsgruppen.

Insgesamt konnte somit in dieser Studie eine bessere Gewebeverträglichkeit von Siliziumnitrid im Vergleich zu Kobalt-Chrom nachgewiesen werden.

Diese Erkenntnis stimmt überein mit Erkenntnissen mehrerer Studien, in welchen die Eigenschaften sowie die Gewebeverträglichkeit von Siliziumnitrid untersucht und mit denen von Kobalt-Chrom in Relation gesetzt wurden^{19,26,35,37,38}.

Für die Beantwortung der Frage nach den Verteilungsmustern von Siliziumnitrid und Kobalt-Chrom, sowie einer möglichen Resorptionsfähigkeit von Siliziumnitrid in vivo, waren mehrere Erkenntnisse in dieser Studie entscheidend.

In Leber, Milz sowie Nieren der untersuchten Tiere wurden keinerlei Partikel gesehen, unabhängig von der Art der eingesetzten Substanzen sowie deren Konzentration oder Expositionszeit auf die untersuchten Gewebestrukturen.

Weiterhin fiel die Verteilung der applizierten Partikel von sowohl Kobalt-Chrom als auch Siliziumnitrid in die regionalen Lymphknoten der rechten Hintergliedmasse mit zunehmender Zeit immer geringer aus, was den Schluss zulässt, dass sowohl Siliziumnitrid- als auch Kobalt-Chrom-Partikel generell eine Verteilung in das umliegende Gewebe erfahren, dass diese Verteilung aber örtlich begrenzt ist und im zeitlichen Verlauf abnimmt.

Ein Hinweis auf die Fähigkeit einer in vivo Resorption von Siliziumnitrid ergibt sich lediglich aus dem Umstand, dass sich bei der Untersuchung auf freie Partikel innerhalb der Kniegelenke zeigte, dass in allen untersuchten Gruppen, die mit Kobalt-Chrom behandelt wurden, freie Partikel innerhalb der rechten, behandelten Kniegelenksstrukturen gefunden wurden, sich aber lediglich in einer von vier Gruppen, welche mit Siliziumnitrid behandelt wurden Hinweise auf freie Partikel fanden.

Eine mögliche Erklärung für dieses Resultat kann in einer schnelleren und/oder höheren Resorptionsrate von Siliziumnitrid im Vergleich zu Kobalt-Chrom liegen.

Um für diese Schlussfolgerung jedoch eine gesicherte und fundierte Aussage treffen zu können, bedarf es weiterer Forschung.

7 Perspektive

Im Hinblick auf die enorm hohe Anzahl an jährlich implantierten Endoprothesen und die daraus resultierenden finanziellen Aufwendungen für die medizinischen Kostenträger sowie den deutlich erkennbaren, steigenden Bedarf an solchen Prothesen kommt der erhöhten Standfestigkeit von Endoprothesen eine grosse wirtschaftliche und gesellschaftliche Bedeutung zu.

Eine verlängerte Standfestigkeit wird massgeblich beeinflusst durch die Eigenschaften der verwendeten Materialien. Für Siliziumnitrid konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass dieses Material sehr gute tribokorrosive Eigenschaften besitzt und somit aus physikalischer und chemischer Sicht ein äusserst vielversprechendes Material für den Einsatz in Endoprothesen darstellt^{6,32,41,42}.

Die vorliegende Studie, welche schwerpunktmässig die biokompatiblen Eigenschaften in vivo untersuchte, ergab im Sinne dieser Fragestellung für Siliziumnitrid günstigere Eigenschaften als diejenigen von Kobalt-Chrom, das seit Jahrzehnten eines der meist verwendeten Materialien in der Endoprothetik darstellt.

Somit untermauern die Ergebnisse dieser Studie die Richtigkeit und Notwendigkeit einer weiterführenden Untersuchung von Siliziumnitrid und dessen Einführung als alternatives und innovatives Material in der Herstellung von Endoprothesen.

8 Literaturverzeichnis

1. Linder R, Muller H, Grenz-Farenholtz B, et al: Replacement of endoprosthetic implants within a two years follow-up period: a statutory health insurance routine data analysis. *BMC Musculoskelet Disord* 13:223, 2012.
2. Malchau H, Herberts P, Eisler T, et al: The Swedish Total Hip Replacement Register. *J Bone Joint Surg Am* 84-A Suppl 2:2-20, 2002.
3. Charnley J: Arthroplasty of the hip. Discussion. . South African Orthopaedic Association 1955.
4. Kirschner P: [Hip endoprosthesis]. *Chirurg* 76:95-103; quiz 104, 2005.
5. Gomez PF, Morcuende JA: A historical and economic perspective on Sir John Charnley, Chas F. Thackray Limited, and the early arthroplasty industry. *Iowa Orthop J* 25:30-37, 2005.
6. Billi F, Benya P, Kavanaugh A, et al: The John Charnley Award: an accurate and extremely sensitive method to separate, display, and characterize wear debris: part 2: metal and ceramic particles. *Clin Orthop Relat Res* 470:339-350, 2012.
7. Ethgen O, Bruyere O, Richy F, et al: Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty. A qualitative and systematic review of the literature. *J Bone Joint Surg Am* 86-a:963-974, 2004.
8. Revell PA: The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. *J R Soc Interface* 5:1263-1278, 2008.
9. Gomez PF, Morcuende JA: Early attempts at hip arthroplasty--1700s to 1950s. *Iowa Orthop J* 25:25-29, 2005.
10. Hwang JS, Mehta AD, Yoon RS, et al: From amputation to limb salvage reconstruction: evolution and role of the endoprosthesis in musculoskeletal oncology. *J Orthop Traumatol* 15:81-86, 2014.
11. Sonntag R, Reinders J, Kretzer JP: What's next? Alternative materials for articulation in total joint replacement. *Acta Biomater* 8:2434-2441, 2012.
12. McKee GK, Watson-Farrar J: Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *J Bone Joint Surg Br* 48:245-259, 1966.
13. Charnley J: Principles and practice in hip replacement. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 192:191-198, 1976.
14. Charnley J: Faltin lecture: evolution of total hip replacement. *Ann Chir Gynaecol* 71:103-107, 1982.
15. Papageorgiou I, Brown C, Schins R, et al: The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 28:2946-2958, 2007.
16. Labek G, Thaler M, Janda W, et al: Revision rates after total joint replacement: cumulative results from worldwide joint register datasets. *J Bone Joint Surg Br* 93:293-297, 2011.
17. Kurtz SM, Ong KL, Schmier J, et al: Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 89 Suppl 3:144-151, 2007.
18. Turger A, Kohler J, Denkena B, et al: Manufacturing conditioned roughness and wear of biomedical oxide ceramics for all-ceramic knee implants. *Biomed Eng Online* 12:84, 2013.
19. Jager M, Wild A, Werner A, et al: [Fracture analysis of a ceramic liner. Is in hip endoprosthesis replacement of ceramic on ceramic components with only one of the corresponding partners justified?]. *Biomed Tech (Berl)* 47:306-309, 2002.

20. Antoniou J, Martineau PA, Filion KB, et al: In-hospital cost of total hip arthroplasty in Canada and the United States. *J Bone Joint Surg Am* 86-a:2435-2439, 2004.
21. Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T: The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res*:S6-15, 2004.
22. Healy WL: Economic considerations in total hip arthroplasty and implant standardization. *Clin Orthop Relat Res*:102-108, 1995.
23. Marques EM, Humphriss R, Welton NJ, et al: The choice between hip prosthetic bearing surfaces in total hip replacement: a protocol for a systematic review and network meta-analysis. *Syst Rev* 5:19, 2016.
24. Hatton A, Nevelos JE, Matthews JB, et al: Effects of clinically relevant alumina ceramic wear particles on TNF-alpha production by human peripheral blood mononuclear phagocytes. *Biomaterials* 24:1193-1204, 2003.
25. Meneghini RM, Hallab NJ, Jacobs JJ: Evaluation and treatment of painful total hip arthroplasties with modular metal taper junctions. *Orthopedics* 35:386-391, 2012.
26. Wooley PH: How has the introduction of new bearing surfaces altered the biological reactions to byproducts of wear and modularity? *Clin Orthop Relat Res* 472:3699-3708, 2014.
27. Catelas I, Wimmer MA, Utzschneider S: Polyethylene and metal wear particles: characteristics and biological effects. *Semin Immunopathol* 33:257-271, 2011.
28. Billi F, Benya P, Kavanaugh A, et al: The John Charnley Award: an accurate and sensitive method to separate, display, and characterize wear debris: part 1: polyethylene particles. *Clin Orthop Relat Res* 470:329-338, 2012.
29. Amstutz HC, Le Duff MJ: Hip resurfacing: history, current status, and future. *Hip Int* 25:330-338, 2015.
30. Langton DJ, Jameson SS, Joyce TJ, et al: Accelerating failure rate of the ASR total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 93:1011-1016, 2011.
31. Pettersson M, Tkachenko S, Schmidt S, et al: Mechanical and tribological behavior of silicon nitride and silicon carbon nitride coatings for total joint replacements. *J Mech Behav Biomed Mater* 25:41-47, 2013.
32. Olofsson J, Pettersson M, Teuscher N, et al: Fabrication and evaluation of SixNy coatings for total joint replacements. *J Mater Sci Mater Med* 23:1879-1889, 2012.
33. Liu A, Richards L, Bladen CL, et al: The biological response to nanometre-sized polymer particles. *Acta Biomater* 23:38-51, 2015.
34. Bader R, Bergschmidt P, Fritsche A, et al: [Alternative materials and solutions in total knee arthroplasty for patients with metal allergy]. *Orthopade* 37:136-142, 2008.
35. Mazzocchi M, Gardini D, Traverso PL, et al: On the possibility of silicon nitride as a ceramic for structural orthopaedic implants. Part II: chemical stability and wear resistance in body environment. *J Mater Sci Mater Med* 19:2889-2901, 2008.
36. Galvin AL, Jennings LM, Tipper JL, et al: Wear and creep of highly crosslinked polyethylene against cobalt chrome and ceramic femoral heads. *Proc Inst Mech Eng H* 224:1175-1183, 2010.
37. Perino G, Ricciardi BF, Jerabek SA, et al: Implant based differences in adverse local tissue reaction in failed total hip arthroplasties: a morphological and immunohistochemical study. *BMC Clin Pathol* 14:39, 2014.
38. Grammatopoulos G, Pandit H, Kamali A, et al: The correlation of wear with histological features after failed hip resurfacing arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 95:e81, 2013.

39. Kwon YM, Ostlere SJ, McLardy-Smith P, et al: "Asymptomatic" pseudotumors after metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: prevalence and metal ion study. *J Arthroplasty* 26:511-518, 2011.
40. Guedes e Silva CC, Konig B, Jr., Carbonari MJ, et al: Tissue response around silicon nitride implants in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 84:337-343, 2008.
41. Bal BS, Rahaman MN: Orthopedic applications of silicon nitride ceramics. *Acta Biomater* 8:2889-2898, 2012.
42. Bal BS, Khandkar A, Lakshminarayanan R, et al: Fabrication and testing of silicon nitride bearings in total hip arthroplasty: winner of the 2007 "HAP" PAUL Award. *J Arthroplasty* 24:110-116, 2009.
43. Olofsson J, Grehk TM, Berling T, et al: Evaluation of silicon nitride as a wear resistant and resorbable alternative for total hip joint replacement. *Biomater* 2:94-102, 2012.
44. Brill W: [Morphologic analysis of endoprosthesis materials with scanning electron microscopy]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 125:553-558, 1987.
45. Zhang W, Titze M, Cappi B, et al: Improved mechanical long-term reliability of hip resurfacing prostheses by using silicon nitride. *J Mater Sci Mater Med* 21:3049-3057, 2010.
46. Paxton E, Cafri G, Havelin L, et al: Risk of revision following total hip arthroplasty: metal-on-conventional polyethylene compared with metal-on-highly cross-linked polyethylene bearing surfaces: international results from six registries. *J Bone Joint Surg Am* 96 Suppl 1:19-24, 2014.
47. Williams DF: On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29:2941-2953, 2008.
48. Williams DF: There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* 35:10009-10014, 2014.
49. Mertz L: What is biocompatibility?: a new definition based on the latest technology. *IEEE Pulse* 4:14-15, 2013.
50. Williams D: Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol* 14:10-13, 2003.
51. Neumann A, Reske T, Held M, et al: Comparative investigation of the biocompatibility of various silicon nitride ceramic qualities in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 15:1135-1140, 2004.
52. Smale G, Bendele A, Horton WE, Jr.: Comparison of age-associated degeneration of articular cartilage in Wistar and Fischer 344 rats. *Lab Anim Sci* 45:191-194, 1995.
53. Howie DW, Vernon-Roberts B, Oakeshott R, et al: A rat model of resorption of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles. *J Bone Joint Surg Am* 70:257-263, 1988.
54. Wang JX, Fan YB, Gao Y, et al: TiO₂ nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection. *Biomaterials* 30:4590-4600, 2009.
55. Iwasaki K, Sudo H, Kasahara Y, et al: Effects of Multiple Intra-articular Injections of 0.5% Bupivacaine on Normal and Osteoarthritic Joints in Rats. *Arthroscopy*, 2016.
56. Yan Z, Xiong J, Zhao C, et al: Decreasing cartilage damage in a rat model of osteoarthritis by intra-articular injection of deoxycholic acid. *Int J Clin Exp Med* 8:9038-9045, 2015.
57. Yang X, Zhu TY, Wen LC, et al: Intraarticular Injection of Allogenic Mesenchymal Stem Cells has a Protective Role for the Osteoarthritis. *Chin Med J (Engl)* 128:2516-2523, 2015.

58. Haga M, Fujii N, Nozawa-Inoue K, et al: Detailed process of bone remodeling after achievement of osseointegration in a rat implantation model. *Anat Rec (Hoboken)* 292:38-47, 2009.
59. Jakobsen SS, Danscher G, Stoltenberg M, et al: Cobalt-chromium-molybdenum alloy causes metal accumulation and metallothionein up-regulation in rat liver and kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:441-446, 2007.
60. Histing T, Garcia P, Holstein JH, et al: Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591-599, 2011.
61. Marenzana M, Vande Velde G: Refine, reduce, replace: Imaging of fibrosis and arthritis in animal models. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 29:715-740, 2015.
62. Eskelund V, Plum CM: Experimental investigations into the healing of fractures. *Acta Orthop Scand* 19:433-475, 1950.
63. Fujii N, Kusakari H, Maeda T: A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction. *J Periodontol* 69:485-495, 1998.
64. Mehta M, Strube P, Peters A, et al: Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 47:219-228, 2010.
65. Pritchard JJ: Repair of fractures of the parietal bone in rats. *J Anat* 80:55-60, 1946.
66. Urist MR, Mc LF: Bone repairs in rats with multiple fractures. *Am J Surg* 80:685-695; passim, 1950.

9 Abkürzungsverzeichnis

Si ₃ N ₄	Siliziumnitrid
CoCr	Kobalt-Chrom
(X)UHMWPE	(kreuzvernetztes) ultra- hochmolekulargewichtiges Polyethylen
MMA	Methylmethacrylat
TGF- α	transformierender Wachstumsfaktor alpha
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
DNS	Desoxyribonukleinsäure
mm ³	Kubikmillimeter
Nm	Nanometer
μ m	Mikrometer
pH	ein Mass für die Aktivität von Protonen einer wässrigen Lösung (Säuregrad)
z.B.	zum Beispiel
g	Gramm
N	Anzahl
μ l	Mikroliter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
°C	Grad Celsius
kg	Kilogramm
ml	Milliliter
mg	Milligramm
s	Sekunde(n)
kHz	Kilohertz

IVC	individuell ventilierter Käfig
Nr.	Nummer
min	Minute(n)
%	Prozent
Abb.	Abbildung
Vol.	Volumen
l	Liter
mm	Millimeter
iNOS	induzierbare NO-Synthase
COX-2	Cyclooxygenase 2
ÜZ	Überlebenszeitraum
p	Minuskel
RI Low	Referenzsubstanz CoCr in geringer Dosierung
RI High	Referenzsubstanz CoCr in hoher Dosierung
TI Low	Testsubstanz Si ₃ N ₄ in geringer Dosierung
TI High	Testsubstanz Si ₃ N ₄ in hoher Dosierung
d	Tag(e)
R	Rechts
L	Links
Hglm.	Hintergliedmasse
Tab.	Tabelle(n)

10 Anhang

10.1 Tabellen

Mittelwerte des Vergleiches der Gewebe von rechten und linken Hintergliedmaßen sowie der rechten und linken Nieren (Deskriptive Statistik)									
Bewertungskriterium	Gewebe/Lokalisation	Behandlung							
		RIHigh2d	RIHigh7d	RILow2d	RILow7d	TIHigh2d	TIHigh7d	TILow2d	TILow7d
Knorpelzellen	FemurRe	1	0.833	1	1.333	0.833	1.833	1	1.333
	FemurLi	1	0.5	1.833	0.333	1	1	0	0.5
	FemurRe	2	1.5	0.667	1	0.833	0.833	1.333	1.333
	FemurLi	1.167	1.833	0.833	0.5	1.5	1	0.833	1.333
	TibiaRe	0.5	0.5	0.5	0.5	1.333	0.5	0.667	0
	TibiaLi	0.5	0.333	0	0	0.5	0.5	0	0.333
KnorpelTidemark	FemurRe	0	0	0	0	0	0	0.167	0
	FemurLi	0	0	0	0.167	0	0	0	0
	FemurRe	0	0	0	0.167	0	0	0	0.167
	FemurLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	TibiaRe	0	0.167	0	0	0	0	0	0
	TibiaLi	0.167	0	0	0	0	0	0	0
Knorpelstruktur	FemurRe	0.333	0.5	0.333	0	0.667	1.167	1.333	0.833
	FemurLi	1.333	1	0.167	0.333	1.167	1.167	0.333	0.833
	FemurRe	0.833	0.333	0.333	0.5	0.333	1.333	1.5	0.833
	FemurLi	0.833	1	0	0.5	1.167	0.833	0.833	0.833
	TibiaRe	0.5	0.5	0.333	1	0.333	1.5	0.667	0.5
	TibiaLi	0.333	0.667	0	0.833	0.5	0.667	1.167	0.5
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	LnPoplitealRe	1.5	2.167	2	0.167	2	1	1.4	2
	LnPoplitealLi	1.5	1.4	1.667	1.2	1	1.833	0.667	1.833
	LnInguinalRe	1.5	1	1.8	0.333	1.833	1	0.75	1.333
	LnInguinalLi	0.833	0.667	0.5	0.4	1	1	0.833	0.8
	NiereRe	0	0	0	0	0	0	0	0
	NiereLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	KniegelenkRe	1.667	0.5	0.167	2.167	1.667	1.5	0	0.333
	KniegelenkLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	COX-2 Bewertung	1.667	1	1.333	0.333	1.5	1.833	1.333	1.167
		1.5	1.167	1.5	1	1.167	1.667	1.333	1
Fettkörper	KniegelenkRe	0.667	1.167	1.333	1.667	0.667	0.667	0.667	0.167
	KniegelenkLi	0	0	0.167	0.167	0	0.167	0	0.167
Anzahl von freien Partikeln	LnPoplitealRe	0.5	0	1	0	0.4	0	0.4	0
	LnPoplitealLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	LnInguinalRe	0.333	0.2	0	0	0.167	0.333	0	0.167
	LnInguinalLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	NiereRe	0	0	0	0	0	0	0	0
	NiereLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	KniegelenkRe	2	0.833	0.167	2.333	0	0	0	1
	KniegelenkLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	INOS-Bewertung	0.5	0.333	0.667	1.5	1.5	1.667	1.333	0.667
		0.167	0.667	0	0.667	0.167	0	0.167	0.167
Anzahl Mastzellen im Fettkörper	KniegelenkRe	8.833	12.5	8	16.667	10.833	12.5	9.167	13.333
	KniegelenkLi	9.167	13.333	9	15.833	5.833	10.833	5.833	14.167
Lokalisation von Partikelablagerungen	LnPoplitealRe	2	1	3	0.167	1.8	1	1.6	0.8
	LnPoplitealLi	1	0.6	0.833	0.4	0.8	1	0.333	0.667
	LnInguinalRe	1.667	1.2	1	0.333	1.333	1.5	0.75	1.333
	LnInguinalLi	0.833	0.667	0.5	0.4	1	0.5	0.833	1
	NiereRe	0	0	0	0	0	0	0	0
	NiereLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	KniegelenkRe	2	1.333	0.167	2.5	0.833	0.833	0	0.833
	KniegelenkLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ortsfremde Zellen	0	0	0	0	0	0.167	0.2	0
		0.167	0	0	0	0.2	0	0	0.167
Struktur	LnPoplitealRe	0.833	0.4	0	0	0	0.167	0	0.167
	LnInguinalRe	0	0	0	0	0	0	0	0.2
	LnInguinalLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	NiereRe	0	0	0	1	0	0	0	0
	NiereLi	0	0	0	0	0	0	0	0
	Synovialmembran	0.833	1	1.5	1.333	1.333	1.5	1.333	1.167
	KniegelenkRe	0.167	0.667	0.833	1.167	0.667	1.333	0.833	0.167
	KniegelenkLi	0.167	0.667	0.833	1.167	0.667	1.333	0.833	0.167

Legende:
 RIHigh2d entspricht Referenzsubstanz hohe Konz. 2 Tage
 RIHigh7d entspricht Referenzsubstanz hohe Konz. 7 Tage
 RILow2d entspricht Referenzsubstanz niedrige Konz. 2 Tage
 RILow7d entspricht Referenzsubstanz niedrige Konz. 7 Tage
 TIHigh2d entspricht Testsubstanz hohe Konz. 2 Tage
 TIHigh7d entspricht Testsubstanz hohe Konz. 7 Tage
 TILow2d entspricht Testsubstanz niedrige Konz. 2 Tage
 TILow7d entspricht Testsubstanz niedrige Konz. 7 Tage

Tab. 10.1/1 „Mittelwerte des Vergleiches der Gewebe von rechten und linken Hintergliedmassen sowie der rechten und linken Nieren (Deskriptive Statistik)“

Signifikanz des Vergleiches der Gewebe von rechter und linker Hintergliedmaßen sowie der rechten und linken Nieren (Wilcoxon Signed Ranks Test)									
Gewebe-Vergleich	Bewertungskriterium	Behandlung							
		RI-High 2d	RI-High 7d	RI-Low 2d	RI-Low 7d	TI-High 2d	TI-High 7d	TI-Low 2d	TI-Low 7d
Kniegelenk/Femur/Links/Rechts	Knorpelzellen	1,000	0,785	0,221	0,194	0,705	0,269	0,157	0,450
Kniegelenk/Femur/Rechts/Rechts		0,269	0,655	0,785	0,564	0,180	0,888	0,581	1,000
Kniegelenk/Tibia/Links/Rechts		1,000	1,000	0,180	0,317	0,180	1,000	0,157	0,317
Kniegelenk/Femur/Links/Rechts	Knorpel/Idemark	1,000	1,000	1,000	0,317	1,000	1,000	0,317	1,000
Kniegelenk/Femur/Rechts/Rechts		1,000	1,000	1,000	0,317	1,000	1,000	1,000	0,317
Kniegelenk/Tibia/Links/Rechts		0,317	0,317	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Kniegelenk/Femur/Links/Rechts	Knorpel/Struktur	0,059	0,180	0,655	0,157	0,408	1,000	0,131	1,000
Kniegelenk/Femur/Rechts/Rechts		1,000	0,102	0,317	1,000	0,059	0,180	0,180	1,000
Kniegelenk/Tibia/Links/Rechts		0,564	0,655	0,317	0,705	0,564	0,180	0,705	1,000
Popliteal/Links/Rechts	Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	1,000	0,496	1,000	0,276	0,131	0,059	0,461	0,157
Inguinal/Links/Rechts		0,102	0,157	0,038	0,317	0,317	0,705	1,000	0,083
Niere/Links/Rechts		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Kniegelenk/Links/Rechts		0,059	0,180	0,317	0,038	0,041	0,041	1,000	0,317
Kniegelenk/Links/Rechts	COX-2-Bewertung	0,564	0,564	0,739	0,194	0,414	0,655	1,000	0,705
Kniegelenk/Links/Rechts	Fettkörper	0,102	0,102	0,038	0,056	0,046	0,083	0,046	1,000
Popliteal/Links/Rechts	Anzahl von freien Partikeln	0,083	1,000	0,046	1,000	0,157	1,000	0,157	1,000
Inguinal/Links/Rechts		0,157	0,317	1,000	1,000	1,000	0,157	1,000	1,000
Niere/Links/Rechts		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Kniegelenk/Links/Rechts		0,046	0,102	0,317	0,034	1,000	1,000	1,000	0,157
Kniegelenk/Links/Rechts	iNOS-Bewertung	0,317	0,157	0,102	0,096	0,038	0,039	0,059	0,083
Kniegelenk/Links/Rechts	Anzahl Mastzellen im Fettkörper	0,705	0,705	0,492	0,680	0,063	0,577	0,102	0,705
Kniegelenk/Links/Rechts	Lokalisation von Partikelablagerungen	0,046	0,102	0,317	0,025	0,025	0,025	1,000	0,180
Popliteal/Links/Rechts		0,083	0,157	0,046	0,564	0,180	1,000	0,109	0,317
Inguinal/Links/Rechts		0,102	0,180	0,083	0,317	1,000	0,197	1,000	0,157
Niere/Links/Rechts		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Popliteal/Links/Rechts	Ortsfremde Zellen	0,317	1,000	1,000	1,000	0,317	0,317	0,317	0,317
Inguinal/Links/Rechts		0,025	1,000	0,083	1,000	1,000	0,317	1,000	1,000
Niere/Links/Rechts		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Popliteal/Links/Rechts	Struktur	0,083	0,414	0,157	0,157	0,046	0,564	0,564	0,157
Inguinal/Links/Rechts		0,157	0,317	0,157	0,317	1,000	0,083	1,000	0,317
Niere/Links/Rechts		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Kniegelenk/Links/Rechts	Synovialmembran	0,046	0,458	0,102	0,705	0,102	0,564	0,453	0,034
Legende: RI-High 2d entspricht Referenzsubstanz hohe Konz. 2 Tage RI-High 7d entspricht Referenzsubstanz hohe Konz. 7 Tage RI-Low 2d entspricht Referenzsubstanz niedrige Konz. 2 Tage RI-Low 7d entspricht Referenzsubstanz niedrige Konz. 7 Tage TI-High 2d entspricht Testsubstanz hohe Konz. 2 Tage TI-High 7d entspricht Testsubstanz hohe Konz. 7 Tage TI-Low 2d entspricht Testsubstanz niedrige Konz. 2 Tage TI-Low 7d entspricht Testsubstanz niedrige Konz. 7 Tage grau hinterlegte Werte entsprechen statistisch signifikanten Werten ($p \leq 0,05$)									

Tab. 10.1/2 „Signifikanzen des Vergleiches der Gewebe von rechter und linker Hintergliedmassen sowie der rechten und linken Nieren (Wilcoxon Signed Ranks Test)“

Tabelle Signifikanzen Vergleich 2 und 7 Tage						
Bewertungskriterium	Gewebe	Behandlung				Vergleich der Werte zwischen 2- und 7 Tagen
		RI _{High}	RI _{Low}	TI _{High}	TI _{Low}	
Struktur	Ln _{popliteal}	1	1	0.008	0.549	Nach 2 Tagen höherer Wert als nach 7 Tagen
Struktur	Ln _{popliteal}	0.686	0.827	0.637	0.026	Nach 7 Tagen höherer Wert als nach 2 Tagen
Struktur	Ln _{inguinal}	0.226	0.491	0.476	0.414	
Struktur	Ln _{inguinal}	1	0.219	1	1	
Struktur	Kidney	1	1	1	1	
Struktur	Kidney	1	1	1	1	
Struktur	Spleen	0.138	1	0.269	0.093	
Struktur	Liver	0.206	1	0.093	0.075	
Ortsfremde Zellen	Ln _{popliteal}	1	1	0.361	0.317	
Ortsfremde Zellen	Ln _{popliteal}	0.361	1	0.273	0.317	
Ortsfremde Zellen	Ln _{inguinal}	0.158	0.112	0.317	0.414	
Ortsfremde Zellen	Ln _{inguinal}	1	1	1	0.273	
Ortsfremde Zellen	Kidney	1	1	1	1	
Ortsfremde Zellen	Kidney	1	1	1	1	
Ortsfremde Zellen	Spleen	1	0.317	1	1	
Ortsfremde Zellen	Liver	0.523	1	1	0.027	Nach 7 Tagen höherer Wert als nach 2 Tagen
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Ln _{popliteal}	0.056	0.005	0.102	0.343	Nach 2 Tagen höherer Wert als nach 7 Tagen
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Ln _{popliteal}	0.102	0.156	0.273	0.269	
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Ln _{inguinal}	0.392	0.049	0.923	0.171	Nach 2 Tagen höherer Wert als nach 7 Tagen
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Ln _{inguinal}	0.593	0.752	0.127	0.83	
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Kidney	1	1	1	1	
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Kidney	1	1	1	1	
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Spleen	1	1	1	1	
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Liver	1	1	1	1	
Anzahl von freien Partikeln	Ln _{popliteal}	0.056	0.003	0.102	0.134	Nach 2 Tagen höherer Wert als nach 7 Tagen
Anzahl von freien Partikeln	Ln _{popliteal}	1	1	1	1	
Anzahl von freien Partikeln	Ln _{inguinal}	0.637	1	0.523	0.414	
Anzahl von freien Partikeln	Ln _{inguinal}	1	1	1	0.273	
Anzahl von freien Partikeln	Kidney	1	1	1	1	
Anzahl von freien Partikeln	Kidney	1	1	1	1	
Anzahl von freien Partikeln	Spleen	1	1	1	1	
Anzahl von freien Partikeln	Liver	1	1	1	1	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Ln _{popliteal}	0.147	0.008	0.036	0.443	Nach 2 Tagen höherer Wert als nach 7 Tagen
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Ln _{popliteal}	0.698	0.502	0.095	0.191	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Ln _{inguinal}	0.34	0.053	0.127	0.114	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Ln _{inguinal}	0.593	0.752	0.505	0.83	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Kidney	1	1	1	1	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Kidney	1	1	1	1	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Spleen	1	1	1	1	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Liver	1	1	1	1	
Knorpelstruktur Femur 1	Stifle	0.386	0.317	0.342	0.611	
Knorpelstruktur Femur 1	Stifle	0.613	0.523	0.674	0.212	
Knorpelstruktur Femur 2	Stifle	0.212	0.598	0.08	0.338	
Knorpelstruktur Femur 2	Stifle	0.432	0.056	0.176	0.73	
Knorpelstruktur Tibia	Stifle	1	0.252	0.057	0.575	
Knorpelstruktur Tibia	Stifle	0.269	0.058	0.575	0.789	
Knorpelzellen Femur 1	Stifle	0.847	0.715	0.177	0.715	
Knorpelzellen Femur 1	Stifle	0.523	0.026	1	0.317	Nach 2 Tagen höherer Wert als nach 7 Tagen
Knorpelzellen Femur 2	Stifle	0.575	0.702	0.857	1	
Knorpelzellen Femur 2	Stifle	0.348	0.598	0.434	0.527	
Knorpelzellen Tibia	Stifle	1	0.674	0.29	0.138	Nach 2 Tagen höherer Wert als nach 7 Tagen
Knorpelzellen Tibia	Stifle	0.847	1	1	0.317	
Knorpel Tidemark Femur 1	Stifle	1	1	1	0.317	
Knorpel Tidemark Femur 1	Stifle	1	0.317	1	1	
Knorpel Tidemark Femur 2	Stifle	1	0.317	1	0.317	
Knorpel Tidemark Femur 2	Stifle	1	1	1	1	
Knorpel Tidemark Tibia	Stifle	0.317	1	1	1	
Knorpel Tidemark Tibia	Stifle	0.317	1	1	1	
Synovialmembran	Stifle	0.733	0.804	1	0.489	
Synovialmembran	Stifle	0.211	0.351	0.118	0.083	
Fettkörper 1	Stifle	0.666	0.49	1	0.093	
Fettkörper 1	Stifle	1	1	0.317	0.317	
Anzahl freier Partikel	Stifle	0.226	0.011	1	0.138	Nach 7 Tagen höherer Wert als nach 2 Tagen
Anzahl freier Partikel	Stifle	1	1	1	1	
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Stifle	0.142	0.012	0.804	0.317	Nach 7 Tagen höherer Wert als nach 2 Tagen
Anzahl von Zellen mit phagozytierten Partikeln	Stifle	1	1	1	1	
Anzahl Mastzellen im Fettkörper	Stifle	0.18	0.059	0.5	0.214	
Anzahl Mastzellen im Fettkörper	Stifle	0.045	0.087	0.072	0.005	Nach 7 Tagen höherer Wert als nach 2 Tagen
COX-2 Bewertung	Stifle	0.175	0.058	0.241	0.665	
COX-2 Bewertung	Stifle	0.589	0.396	0.309	0.495	
iNOS-Bewertung	Stifle	0.575	0.073	0.72	0.118	
iNOS-Bewertung	Stifle	0.093	0.058	0.317	1	
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Stifle	0.373	0.01	1	0.14	Nach 7 Tagen höherer Wert als nach 2 Tagen
Lokalisation Partikel-Ablagerungen	Stifle	1	1	1	1	
Legende: RI _{High} entspricht Referenzsubstanz hoher Konz. RI _{Low} entspricht Referenzsubstanz niedriger Konz. TI _{High} entspricht Testsubstanz hoher Konz. TI _{Low} entspricht Testsubstanz niedriger Konz. grau hinterlegte Werte entsprechen statistisch signifikanten Werten (p ≤ 0,05)						

Tab. 10.1/3 „Tabelle Signifikanzen Vergleich 2 und 7 Tage“

10.2 Abbildungen

Prozedur: Res IHC Omni-UltraMap HRP XT (Zusammenfassung)		
Discovery XT Färbemodul		
Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich		
Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
230	iNOS/CC1st (MSRU)	26.06.2015
1	Patienten-Material [Ausgewählt]	
2	Nicht-Paraffin [Ausgewählt]	
3	Objekträger nass laden [Ausgewählt]	
4	Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]	
5	Cell Conditioner 1 [Ausgewählt]	
6	Mildes CC1 [Ausgewählt]	
7	Standard CC1 [Ausgewählt]	
8	Antikörper [Ausgewählt] 1:100	
9	Antikörper-Titration [Ausgewählt]	
10	Standard Ak-Inkubation (Titration) [Ausgewählt]	
11	Inkubieren für [60 Minuten] (Primär Antikörper)	
12	1 Tropfen von [OMap anti-Rb HRP] (Multimer HRP) auftragen, LCS auftragen u. für [16 Minuten] inkubieren.	
13	Gegenfärbung [Ausgewählt]	
14	Standard [Ausgewählt]	
15	1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.	
16	Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]	
17	1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.	
18	Objekträger Reinigung [Ausgewählt]	

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe

Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich
NexES v10.6

Gedruckt 17.05.2016 09:14:42
Seite 1 von 1

Tab. 10.2/1 Färbeprotokoll 1

Prozedur: Res IHC Omni-UltraMap HRP XT (Zusammenfassung)

Discovery XT Färbemodul

Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
235	COX2/CC2m(MSRU)	26.06.2015

- 1 Patienten-Material [Ausgewählt]
- 2 Nicht-Paraffin [Ausgewählt]
- 3 Objektträger nass laden [Ausgewählt]
- 4 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 5 Cell Conditioner 2 [Ausgewählt]
- 6 Mildes CC2 [Ausgewählt]
- 7 Antikörper [Ausgewählt]
- 8 Antikörper-Titration [Ausgewählt] *1:600*
- 9 Standard Ak-Inkubation (Titration) [Ausgewählt]
- 10 Inkubieren für [60 Minuten] (Primär Antikörper)
- 11 1 Tropfen von [OMap anti-Rb HRP] (Multimer HRP) auftragen, LCS auftragen u. für [16 Minuten] inkubieren.
- 12 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 13 Standard [Ausgewählt]
- 14 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.
- 15 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 16 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 17 Objektträger Reinigung [Ausgewählt]

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
 Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich
 NexES v10.6

Gedruckt 17.05.2016 09:15:02
 Seite 1 von 1

Tab. 10.2/2 Färbeprotokoll 2

Vollendeter Färbelauf							
Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich							
Lauf-Nr. 2226		Login / Benutzer Kennwörter deaktiviert					
Instrument Name Harry		Laufstart 12.05.2016 10:04:31					
Instrument Typ Discovery XT Färbemodul		Laufende 12.05.2016 14:26:10					
Detaillierter Reagenzienverbrauch							
Position	Reagenz	Serien-Nr.	Tests Aufgetragen	Verbleibende Tests*	Tests / Spender*	Lot-Nr. / Hauptlot-Nr.**	Verfallsdatum
15	BLUING REAGENT	175216	22	0	0	F04981	28.08.2017
16	HEMATOXYLIN	873337	22	108	108	F03826	28.06.2017
19	Inhibitor CM	68388	22	16	16	F07642 **	28.05.2017
20	DAB CM	67872	22	16	16	F07642 **	28.05.2017
21	H2O2 CM	70692	22	16	16	F07642 **	28.05.2017
22	Copper CM	67895	22	16	16	F07642 **	28.05.2017
24	OMap anti-Rb HRP	69953	22	0	0	F07277	28.10.2016
Protokoll Detail							
Position	Protokoll	Protokoll-Nr.	Case ID+Block ID+Slide ID	Färbung	Hintergrund	Kommentar	Gegen - Zeichnung
1	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-018-B 1:600	+ / -			
2	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-018-A 1:600	+ / -			
3	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-017-B 1:600	+ / -			
4	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-017-A 1:600	+ / -			
5	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-016-B 1:600	+ / -			
6	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-016-A 1:600	+ / -			
7	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-015-B 1:600	+ / -			
8	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-015-A 1:600	+ / -			
9	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-014-B 1:600	+ / -			
10	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-014-A 1:600	+ / -			
11	COX2/CC2m(MSRU)	235	Kontrolle 1:600	+ / -			
13	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-018-B 1:100	+ / -			
14	iNOS/CC1st (MSRU)	230	Kontrolle 1:100	+ / -			
15	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-014-A 1:100	+ / -			
16	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-014-B 1:100	+ / -			
17	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-015-B 1:100	+ / -			
18	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-017-B 1:100	+ / -			
19	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-016-B 1:100	+ / -			
20	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-016-A 1:100	+ / -			
21	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-015-A 1:100	+ / -			
22	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-018-A 1:100	+ / -			
23	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-017-A 1:100	+ / -			
System-Meldungen							
Meldung	Zeitpunkt					Gegen - Zeichnung	
12-0: Programm des Färbemoduls vollständig abgelaufen	12.05.2016 14:26:44					Kennwörter deaktiviert	
<p>* Verbleibende Spenden beziehen sich auf den Zeitpunkt des Berichts. ** Bezeichnet die Masterlots</p> <p>Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich NexES v10.6</p> <p style="text-align: right;">Gedruckt 17.05.2016 09:16:08 Seite 1 von 1</p>							

Tab. 10.2/3 Färbeprotokoll 3

Vollendeter Färbelauf

Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich

Lauf-Nr. 2227

Login / Benutzer Kennwörter deaktiviert

Instrument Name Harry

Laufstart 13.05.2016 09:24:14

Instrument Typ Discovery XT Färbemodul

Laufende 13.05.2016 13:54:50

Detaillierter Reagenzienverbrauch

Position	Reagenz	Serien-Nr.	Tests Aufgetragen	Verbleibende Tests*	Tests / Spender*	Lot-Nr. / Hauptlot-Nr.**	Verfallsdatum
12	Inhibitor CM	68388	30	16	16	F07642 **	28.05.2017
13	DAB CM	67872	30	16	16	F07642 **	28.05.2017
14	H2O2 CM	70692	30	16	16	F07642 **	28.05.2017
15	Copper CM	67895	30	16	16	F07642 **	28.05.2017
17	OMap anti-Rb HRP	69953	16	0	0	F07277	28.10.2016
18	OMap anti-Rb HRP	70289	14	111	111	F09081	28.12.2016
21	BLUING REAGENT	203651	2	248	248	F06580	28.09.2017
22	BLUING REAGENT	175216	28	0	0	F04981	28.08.2017
23	HEMATOXYLIN	873337	30	108	108	F03826	28.06.2017

Protokoll Detail

Position	Protokoll	Protokoll-Nr.	Case ID+Block ID+Slide ID	Färbung	Hintergrund	Kommentar	Gegen - Zeichnung
1	iNOS/CC1st (MSRU)	230	Kontrolle 1:100	+ / -			
2	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-019-A 1:100	+ / -			
3	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-019-B 1:100	+ / -			
4	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-020-B 1:100	+ / -			
5	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-020-A 1:100	+ / -			
6	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-021-A 1:100	+ / -			
7	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-021-B 1:100	+ / -			
8	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-022-B 1:100	+ / -			
9	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-022-A 1:100	+ / -			
10	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-023-A 1:100	+ / -			
11	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-023-B 1:100	+ / -			
12	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-024-B 1:100	+ / -			
13	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-024-A 1:100	+ / -			
14	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-025-A 1:100	+ / -			
15	iNOS/CC1st (MSRU)	230	P16-025-B 1:100	+ / -			
16	COX2/CC2m(MSRU)	235	Kontrolle 1:600	+ / -			
17	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-019-A 1:600	+ / -			
18	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-019-B 1:600	+ / -			
19	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-020-B 1:600	+ / -			
20	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-020-A 1:600	+ / -			
21	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-022-A 1:600	+ / -			
22	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-022-B 1:600	+ / -			
23	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-023-B 1:600	+ / -			
24	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-023-A 1:600	+ / -			
25	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-024-A 1:600	+ / -			
26	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-021-B 1:600	+ / -			
27	COX2/CC2m(MSRU)	235	P16-021-A 1:600	+ / -			

* Verbleibende Spenden beziehen sich auf den Zeitpunkt des Berichts. ** Bezeichnet die Masterlots

Institut fuer Veterinaerpathologie, Winterthurerstrasse 268 8057 Zuerich
NexES v10.6

Gedruckt 17.05.2016 09:15:44

Seite 1 von 2

Tab. 10.2/4 Färbeprotokoll 4

Tab. 10.2/5 Färbeprotokoll 5

49

mpz Institut für Veterinärpathologie
der Universität Zürich

MethodeFärbemethode: Toluidinblau (LM)

Tol

(Toluidinblau)
Mastzellfärbung nach Unna

1. Schnitte entparaffinieren
2. Polychromlösung 5 Min.
3. Spülen in Wasser
4. Differenzieren in Essigsäure 1%
5. Spülen in Wasser
6. Abtrocknen zwischen Fliesspapier
7. Kurz schwenken in 100% Ethanol
8. Abtrocknen zwischen Fliesspapier
9. Xylol und eindecken

Resultat:

Mastzellgranula
Kerne

rot-violett
blau

Verteiler: 102, 125
Erstellt am: 02.02.1999
Letzte Revision am: 12.10.2004

durch: RW
durch: RW

freigegeben am: 31.08.1999
freigegeben am: 19.10.2004

Seite 1 von 2
durch: AP
durch: AP

Tab. 10.2/6 Färbeprotokoll 6

**Lösungen:****Blaue Polychromlösung:**

Methylenblau (direkt in 100 ml Erlenmeyer einwiegen)	0,5	g
Toluidinblau (direkt in 100 ml Erlenmeyer einwiegen)	0,5	g

- Beides separat in wenig 70%igem Ethanol aus Spritzflasche lösen ca. je 5 ml
- ✗ ✗ ▪ Herstellen von 100 ml 1%ige, wässrige K_2CO_3 . *AS*
- 20 ml Kaliumcarbonatlösung zu dem gelösten Methylenblau geben.
- Mit den restlichen 80 ml das gelöste Toluidinblau ausspülen und zum Methylenblau giessen. (Mehrere kleine Portionen)
- Dieses Gemisch 2 Minuten unter ständigem Rühren kochen, erkalten lassen, filtrieren.

(Die Lösung ist ca. 6 Monate haltbar. Verbrauchte, alte Lösung wirkt wässrigblau)

Tab.10.2/7 Färbeprotokoll 7

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Brigitte von Rechenberg für die Vergabe dieses spannenden Promotions-Themas sowie für Ihre fortwährende Unterstützung und Betreuung sowohl im fachlichen als auch persönlichen Bereich bedanken.

Ebenso danke ich ganz herzlich Katja Nuss, denn eine bessere Betreuerin hätte ich nicht haben können. Ohne Ihre stetige Motivation und fortwährende Unterstützung in allen Bereichen wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Hans Geyer danke ich ganz herzlich für das Übernehmen des Koreferats, sein Interesse und Engagement, und die unkomplizierte und konstruktive Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich selbstverständlich auch bei meinen Projektpartnern für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank an Agnieszka Karol für Ihre fachliche Unterstützung in allen Bereichen, speziell im Bereich der Betreuung und dem Umgang mit meinen Tieren, der Histopathologie sowie für ihre herzliche und sonnige Art.

Henning Richter danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung der statistischen Auswertung und für einige unvergessliche Momente.

Vielen Dank an Karina Klein für Ihre Unterstützung bei sämtlichen technischen und alltäglichen Problemen und für viele schöne Abende.

Salim Darwiche danke ich für seine Hilfestellungen und seinen Rat zu jeder Zeit sowie für seine Backkünste.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Käthi Kämpf und Silvana Resegatti für die angenehme Zusammenarbeit und ihre Unterstützung in allen Situationen sowie bei Sabine Koch für ihre kompetente Hilfe und Beratung und ihre herzliche Art.

Vielen Dank dem gesamten Team des BZL, speziell Flora Nicholls, die immer da war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlichen Dank an Aymone Lenisa für Ihre fachliche Kompetenz und ihre Geduld, ohne die ich wohl noch immer im Labor stehen würde.

Ganz speziell möchte ich mich bei Sophie Schöberl und Serah Saitowitz bedanken, die mich schon seit Beginn meines Studiums und später als gute Kollegen und noch bessere Freunde durch mein Leben begleiteten, sowie bei Phillip Kindt, den ich durch mein

Doktorat erst als Kollegen und Mitstreiter und sehr schnell auch als guten und verlässlichen Freund kennen und schätzen gelernt habe.

Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen und für Eure Freundschaft, Eure Hilfe und die Zeit, die ich mit Euch verbringen durfte kann ich nicht dankbar genug sein!

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Dagmar Verdino für Ihre Freundschaft, Ihre direkte und unkomplizierte Art, Ihre Verlässlichkeit und Offenheit, Ihren unschlagbaren Wiener Charme und natürlich für Ihre wunderbare Gastfreundschaft.

Selbstverständlich geht mein Dank auch an meine Mitstreiter Larissa Arendt, Vanessa Graf, Boaz Abraham, Michael Künzler sowie Marie Schlote und David Michalik - ich hätte mir kaum bessere Kollegen und grössere Unterstützung wünschen können!

Bedanken möchte ich mich auch bei Ramon Bucher, Mario Benn, Anika Drechsler, Valentin Reichle, Jola Plihal sowie Nadja Wolfer, die vor mir kamen und wieder gingen und mir den Einstieg leicht gemacht und den Weg geebnet haben durch Ihre Erfahrung, Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Für Ihre stets freundliche Art und Ihre Hilfe und Beratung in allen Bereichen danke ich Gabriele Schmidt und Ljubica Dimbrek.

Peter Kronen danke ich für seine Erfahrung und seine Ratschläge, seinen Witz und seine besonnene Art sowie seinen guten Geschmack für Whisky.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Mutter Marianne Köck-Hipp und meinem Vater Dr. Wolfgang Hipp sowie meinen Brüdern Manuel und Lorenz.

Mich für alles zu bedanken, was Ihr für mich getan habt, würde definitiv den Rahmen sprengen, darum möchte ich nur sagen: Ich könnte mir keine bessere Familie wünschen und ich liebe Euch alle von ganzem Herzen und bin stolz, Teil davon sein zu dürfen!

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei meiner Freundin Bettina Göttel dafür bedanken, dass sie nun schon seit so langer Zeit an meiner Seite ist, dass sie mich erträgt und für die Geborgenheit, Liebe und Zuversicht, die sie mir gibt.

Natürlich danke ich auch meiner gesamten Verwandtschaft für ihre ständige Unterstützung, ihren Rückhalt und dafür, mir das Gefühl zu geben, Teil von etwas ganz Besonderem zu sein und der Fähigkeit, mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückzuholen.

Ausserdem möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, ohne Euch wäre es nicht klargegangen – Ihr habt mich immer unterstützt, auch da, wo es sonst keiner konnte! Danke, Jungs - und möge die Macht mit Euch sein!

Zu guter Letzt möchte ich auf die 48 Ratten, die für diesen Versuch haben sterben müssen, verweisen und hoffe, dass diese Tode in der Zukunft einen Sinn gehabt haben werden, der diese irgendwann aufzuwiegen vermag.

Curriculum Vitae

Vornamen, Name:	Florian Jo, Hipp
Geburtsdatum:	11.09.1985
Geburtsort:	Dachau
Nationalität:	deutsch
Schulausbildung:	
09/1995 - 07/2003	Limes-Gymnasium Welzheim Welzheim, Deutschland
09/2003 - 07/2006	Technisches Gymnasium Grafenbergschule Schorndorf, Deutschland
Höchster Schulabschluss:	
26/06/2006	Abitur
Studium:	
09/2007 – 09/2009	Studium der Tiermedizin Szént Istvan Universität Budapest Budapest, Ungarn
04/2010 - 03/2014	Studium der Tiermedizin Freie Universität Berlin Berlin, Deutschland
Abschlussprüfung med. vet.:	
12/03/2014	Staatsexamen/Approbation als Tierarzt
Doktorat:	
01/2015 – 08/2016	Anstellung als Doktorand Leitung: Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg Department für Pferde Abteilung Musculoskeletal Research Unit Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst
Fachrelevante Anstellungen:	
05/2014 – 10/2014	Assistentztierarzt AniCura Kleintierzentrum Heilbronn, Heilbronn, Deutschland
